

**EVALUACIÓN DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE 34
EXTRACTOS METANÓLICOS DE PLANTAS DE LA
ECORREGIÓN CAFETERA COLOMBIANA**

AURA MARÍA BLANDÓN OSORIO

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
LABORATÓRIO DE PESQUISA EM RECURSOS NATURAIS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA (MACEIÓ,
BRASIL)**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CIÊNCIAS DE SAÚDE DE
ALAGOAS (MACEIÓ, BRASIL)**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
ESCUELA DE QUÍMICA (PEREIRA, COLOMBIA)**

2013

EVALUACIÓN DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS
EXTRACTOS METANÓLICOS DE PLANTAS DE LA ECORREGIÓN
CAFETERA COLOMBIANA

AURA MARÍA BLANDÓN OSORIO

Proyecto de grado para optar al título de:
Químico Industrial

Director:

Dr. Oscar Marino Mosquera Martínez

Asesores:

M.Sc. Luana Luzia Santos Pires

Dra. Aldenir Feitosa dos Santos

Dr. Karlos Antônio Lisboa Ribeiro Júnior

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
LABORATÓRIO DE PESQUISA EM RECURSOS NATURAIS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA (MACEIÓ, BRASIL)

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CIÊNCIAS DE SAÚDE DE ALAGOAS
(MACEIÓ, BRASIL)

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
ESCUELA DE QUÍMICA (PEREIRA, COLOMBIA)

2013

A mi hermana Angélica Blandón Osorio la razón de mi constante esfuerzo, porque espero ser siempre un ejemplo y una amiga.

TABLA DE CONTENIDO

Pág.

TABLA DE CONTENIDO.....	IV
INDICE DE TABLAS	VII
INDICE DE FIGURAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT	X
RESUMO	XI
AGRADECIMIENTOS	XII
1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. BACTERIA E INFECCIÓN, ANTIBACTERIANO Y RESISTENCIA MICROBIANA.....	1
1.1.1. Características de las bacterias	1
1.1.2. Infección y enfermedad infecciosa	2
1.1.3. Compuestos antimicrobianos	4
1.1.4. Resistencia microbiana	5
1.1.5. Mecanismos de resistencia microbiana adquirida	5
1.1.6. Métodos para la determinación de actividad antibacteriana	7
1.2. ESTRÉS OXIDATIVO.....	8
1.2.1. Radicales libres y especies reactivas	8
1.2.2. Estrés oxidativo	9
1.2.3. Enfermedades asociadas a las especies reactivas de oxígeno	9
1.2.4. Compuestos antioxidantes.....	9
1.2.5. Métodos para determinar actividad antioxidante	11
1.2.6. Ensayo de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH*	11
1.3. <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	12
1.3.1. Características generales de <i>Aedes aegypti</i>	12

1.3.2.	Virus del dengue	14
1.3.3.	Virus de la fiebre amarilla	14
1.3.4.	Control vectorial de <i>Aedes aegypti</i>	15
1.4.	GENERALIDADES DE LAS FAMILIAS BOTÁNICAS <i>SOLANACEAE</i> , <i>PIPERACEAE</i> Y <i>EUPHORBIACEAE</i>	16
1.4.1.	Familia <i>Solanaceae</i>	16
1.4.2.	Familia <i>Piperaceae</i>	17
1.4.3.	Familia <i>Euphorbiaceae</i>	18
2.	JUSTIFICACIÓN	18
3.	OBJETIVOS	19
3.1.	OBJETIVO GENERAL	19
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4.	SECCIÓN EXPERIMENTAL	20
4.1.	MATERIALES	20
4.1.1.	Reactivos	20
4.1.2.	Materiales y equipos	20
4.1.3.	Material vegetal	20
4.1.4.	Obtención de los extractos	22
4.2.	EVALUACIÓN DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS	22
4.2.1.	Ubicación	22
4.2.2.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA CEPAS DE REFERENCIA Y AISLADOS CLÍNICOS	22
4.2.2.1.	Microorganismos de ensayo	22
4.2.2.2.	Antibiograma	23
4.2.2.3.	Preparación del extracto	23
4.2.2.4.	Preparación del inóculo	23
4.2.2.5.	Ensayo en microplacas	23
4.2.2.6.	Lectura de las microplacas	23
4.2.3.	ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE DPPH [•]	24

4.2.3.1.	Preparación de las soluciones de los extractos.....	24
4.2.3.2.	Evaluación de la actividad antioxidante	24
4.2.4.	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA CONTRA <i>Aedes Aegypti</i>	26
4.2.4.1.	Preparación de las soluciones de los extractos.....	26
4.2.4.2.	Evaluación de la actividad larvicida	26
4.3.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
5.1.	RESULTADOS DEL ESTUDIO DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	28
5.2.	RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE	36
5.3.	RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA.....	40
6.	CONCLUSIONES	41
7.	PERSPECTIVAS	42
8.	BIBLIOGRAFÍA	42
9.	ANEXOS	47
9.1.	ANEXO 1. Información de los antibióticos ante los cuales presentan resistencia las bacterias aisladas clínicamente.....	47
9.2.	ANEXO 2.....	55
9.3.	ANEXO 3. Porcentaje de actividad antioxidante para cada extracto a las diferentes concentraciones evaluadas.....	59
9.4.	ANEXO 4. Resultados de la evaluación de actividad larvicida.	60
9.5.	ANEXO 5. Resultados de la marcha fitoquímica de los extractos evaluados (Fuente: Grupo de Investigación Biotecnología y Productos naturales, GBPN, Universidad Tecnológica de Pereira)	61
9.6.	ANEXO 6. Resultados de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para los grupos definidos por las siete concentraciones de extracto.....	63
9.7.	ANEXO 7. Resultados de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para los grupos definidos por las tres familias botánicas a las cuales pertenecen los extractos....	64

INDICE DE TABLAS

Pág

Tabla 1. Características generales y enfermedades producidas por las bacterias estudiadas (Madigan, et al., 2003) (Singh, 2010).	3
Tabla 2. Ensayos de capacidad antioxidante <i>In vitro</i> (Huang, et al., 2005).	11
Tabla 3. Especies vegetales para la evaluación como antibacterianos, larvicidas y antioxidantes.	21
Tabla 4. Códigos de las bacterias estudiadas.	22
Tabla 5. Resultados de la evaluación como antibacterianos de los extractos metanólicos de cada especie vegetal.	30
Tabla 6. Porcentaje de actividad antioxidante a 500 µg/mL y 125 µg/mL y EC ₅₀ para los extractos metanólicos de las especies vegetales evaluadas.	37
Tabla 7. Resultados de la actividad larvicida de las especies vegetales de la familia <i>Piperaceae</i>	40

INDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Estructura de una célula bacteriana. (Tortora, et al., 2007).....	1
Figura 2. Representación de los puntos de acción de los antimicrobianos (Pumarola, 1991)4	4
Figura 3. Mecanismos de resistencia bacteriana (Moreno M, et al., 2009).	6
Figura 4. Clasificación de los métodos microbiológicos para detección de actividad. (Choma y Grzelak, 2011).....	7
Figura 5. Reducción del oxígeno en la formación de especies reactivas de oxígeno (Devlin, 2004).	8
Figura 6. Estructuras químicas de algunos antioxidantes secundarios.	10
Figura 7. Reacción del radical DPPH [•] con un compuesto antioxidante.	12
Figura 8. Ciclo larvario del mosquito <i>Aedes aegypti</i> (Rojas, 2007).	13
Figura 9. Distribución geográfica de la familia <i>Solanaceae</i> (Heywood 1985).	16
Figura 10. Distribución geográfica de la familia <i>Piperaceae</i> (Heywood 1985).	17
Figura 11. Distribución geográfica de la familia <i>Euphorbiaceae</i> (Heywood 1985).	18
Figura 12. Reacción del MTT en presencia de actividad metabólica.	24
Figura 13. Diagrama de las diluciones realizadas para la medición de la absorbancia.	25
Figura 14. Diagrama de las diluciones realizadas al extracto para la evaluación como larvicida.	26
Figura 15. Diagrama de la cantidad de extractos que fueron activos contra al menos una de las bacterias estudiadas.	31
Figura 16. Gráfico de barras del número de extractos que presentaron actividad contra cada una de las bacterias estudiadas.	34
Figura 17. Gráfico de barras del número de extractos que presentaron actividad alta contra cada una de las bacterias estudiadas.	34

RESUMEN

La diversidad de plantas en Colombia comprende 55.000 especies, de las cuales la tercera parte son endémicas. Esta riqueza floral supone una inmensa fuente de productos naturales con posibles usos en farmacología, como antibacterianos, antioxidantes, anticarcinogénicos, entre otros. La ecorregión Eje Cafetero posee 28.563 kilómetros cuadrados, territorio que ha sido reconocido internacionalmente como de importancia global dada su amplia biodiversidad, gran número de endemismos y el considerable grado de amenaza a sus ecosistemas. Con el objeto de contribuir con estudios de bioprospección de la flora de nuestro país, en este proyecto se evaluó la actividad antibacteriana, antioxidante y larvicida de 34 extractos metanólicos de especies de las familias *Solanaceae*, *Piperaceae* y *Euphorbiaceae* recolectadas en la ecorregión cafetera Colombiana.

El potencial de los extractos como antibacterianos fue evaluado a una concentración de 1 mg/L frente a las cepas de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705 y los aislados clínicos multirresistentes del Hospital General del Estado, Alagoas, Brasil, *Staphylococcus aureus* IC262, *Pseudomonas aeruginosa* IC148 y *Acinetobacter baumannii* IC89, utilizando microplacas y el ensayo colorimétrico del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) para evidenciar la actividad metabólica después de 20 horas. De los 34 extractos evaluados, 18 (53 %) fueron activos contra al menos una de las bacterias de prueba. Las especies *Solanum sp.* y *Piper pesaresanum* presentaron alta actividad contra *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* IC262 y *A. baumannii* IC89.

La capacidad antioxidante de los extractos se determinó utilizando el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), realizando diluciones sucesivas del extracto a partir de una concentración inicial de 500 µg/mL hasta 7,8125 µg/mL. Los extractos metanólicos de las especies *Lycianthes radiata*, *Piper pesaresanum* y *Piper daniel-gonzalezii* a una concentración de 500 µg/mL y las especies *Acalypha diversifolia* y *Hyeronimia antioquiensis* a 125 µg/mL, presentaron un porcentaje de actividad antioxidante de 100%. Para las especies *Hyeronimia antioquiensis*, *Mabea montana*, *Alchornea grandis* y *Alchornea* se obtuvieron EC₅₀ iguales a 0,686, 12,35, 13,01 y 30,67 µg/mL, respectivamente, todas estas pertenecientes a la familia *Euphorbiaceae*.

Siete extractos de la familia *Piperaceae* se evaluaron como larvicidas frente a *Aedes aegypti* en su cuarto estadio larval a una concentración igual a 100 ppm, solamente el extracto de *Piper pesaresanum* presentó actividad, obteniéndose un porcentaje de mortalidad de 50% después de 24 horas y de 70 % transcurridas 48 horas de exposición.

Palabras clave: *Aedes aegypti*, Actividad antibacteriana, Actividad antioxidante, Bacteria, Biodiversidad, Bioprospección, DPPH, Extracto vegetal, Larvicida, Resistencia microbiana.

ABSTRACT

The diversity of plants in Colombia includes 55.000 species, of which the third part are endemic, this floral wealth supposes a great font of natural products with possible uses in pharmacology, such as antibacterial, antioxidant, anticarcinogenic agents, among other active agents. The coffee-growing eco-region is a 28.563 square kilometers territory, which has been internationally recognized as globally important due its huge biodiversity, big number of endemisms and the considerable threat to its ecosystems. In order to contribute with bioprospection studies on the Colombian flora, in this project was evaluated the antibacterial, antioxidant and larvicidal activity of 34 methanolic extracts from species belonging to *Solanaceae*, *Piperaceae* and *Euphorbiaceae* families recollected on the Colombian coffee-growing eco-region.

The potential of the extracts as antibacterial agent was evaluated at 1 mg/mL concentration against bacterial species *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705 and the multiresistant clinical isolates from Hospital Geral do Estado, Alagoas, Brazil, *Staphylococcus aureus* IC262, *Pseudomonas aeruginosa* IC148 y *Acinetobacter baumannii* IC89 using microplates and the colorimetric assay of 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) to evidence the metabolic activity after 20 hours. 18 out of 34 evaluated extracts (53%) were active to, at least, one of the test bacteria. The species *Solanum sp.* and *Piper pesaresanum* displayed strong activity against *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* IC262 y *A. baumannii* IC89.

The antioxidant capacity of extracts was determined using the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), doing successive dilutions of extract from a 500 µg/mL initial concentration to 7.8125 µg/mL. The methanolic extracts of the species *Lycianthes radiata*, *Piper pesaresanum* and *Piper daniel-gonzalezii* at a concentration of 500 µg/mL and the species *Acalypha diversifolia* and *Hyeronimia antioquiensis* at 125 µg/mL, presented a 100% of antioxidant activity. To the *Hyeronimia antioquiensis*, *Mabea montana*, *Alchornea grandis* and *Alchornea* species (*Euphorbiaceae*), the EC₅₀ obtained values were equal to 0.686, 12.35, 13.01 y 30.67 µg/mL, respectively.

Seven extracts from the *Piperaceae* family were evaluated as larvicidal agents against fourth instar larvae of *Aedes aegypti* at a 100 ppm concentration, only the *Piper pesaresanum* extract presented activity, obtaining a 50% and 70 % of mortality after 24 and 48 hours of exposition, respectively.

Key words: *Aedes aegypti*, Antibacterial activity, Antioxidant activity, Bacteria, Biodiversity, Bioprospection, DPPH, Microbial resistance, Larvicide, Vegetable extract.

RESUMO

A diversidade de plantas na Colômbia compreende 55.000 espécies, das quais a terceira parte são endêmicas, esta riqueza floral supõe uma imensa fonte de produtos naturais com possíveis usos na farmacologia, como antibacterianos, antioxidantes, anticarcinogênicos, entre outros. A ecorregião Eixo Cafeeiro possui 28.563 quilômetros quadrados, território que tem sido reconhecido internacionalmente como importante globalmente dada a sua grande biodiversidade, grande número de endemismos e o considerável grau de ameaça aos seus ecossistemas. Visando a contribuir com estudos de bioprospecção da flora do nosso país, neste projeto foi avaliada a atividade antibacteriana, antioxidante e larvicida de 34 extratos metanólicos de espécies das famílias *Solanaceae*, *Piperaceae* e *Euphorbiaceae* coletadas na ecorregião cafeeira.

O potencial dos extratos como antibacterianos foi avaliado a uma concentração de 1 mg/L frente as cepas de referência *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705 e os isolados clínicos multirresistentes do Hospital Geral do Estado, Alagoas, Brasil, *Staphylococcus aureus* IC262, *Pseudomonas aeruginosa* IC148 y *Acinetobacter baumannii* IC89, usando microplacas e o ensaio colorimétrico do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) para evidenciar a atividade metabólica após 20 horas. Dos 34 extratos avaliados, 18 (53%) foram ativos contra pelo menos uma das bactérias de proba. As espécies *Solanum sp.* e *Piper pesaresaum* exibiram alta atividade contra *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* IC262 e *A. baumannii* IC89.

A capacidade antioxidante dos extratos foi determinada usando o radical livre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), realizando diluições sucessivas do extrato a partir da uma concentração inicial de 500 µg/mL até 7,8125 µg/mL. Os extratos metanólicos das espécies *Lycianthes radiata*, *Piper pesaresanum* e *Piper daniel-gonzalezii* a uma concentração de 500 µg/mL e as espécies *Acalypha diversifolia* e *Hyeronimia antioquiensis* a 125 µg/mL, apresentaram um percentagem de atividade antioxidante de 100%. Para as espécies *Hyeronimia antioquiensis*, *Mabea montana*, *Alchornea grandis* e *Alchornea* obtiveram-se EC₅₀ iguais a 0,686, 12,35, 13,01 y 30,67 µg/mL, respectivamente, todas estas espécies pertencentes à família *Euphorbiaceae*.

Sete extratos da família *Piperaceae* foram avaliados como larvicidas frente *Aedes aegypti* no seu quarto estágio larval a uma concentração igual a 100 ppm, somente o extrato de *Piper pesaresanum* exibiu atividade, sendo obtido uma porcentagem de mortalidade de 50% depois de 24 horas e de 70 % após 48 horas de exposição.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, Atividade antibacteriana, Atividade antioxidante, Bactéria, Biodiversidade, Bioprospecção, DPPH, Extrato vegetal, Larvicida, Resistencia microbiana.

AGRADECIMIENTOS

La autora del proyecto expresa su gratitud a:

Mis padres por su amor y apoyo incondicional en el transcurso de mi vida y de mi carrera profesional. Ser un motivo de orgullo para ustedes fue un motor para el buen desempeño y el desarrollo de este proyecto.

Mi hermanita por su amor, apoyo y alegría que fueron siempre un estímulo para permanecer en mi carrera y el desarrollo de este trabajo.

Mi familia por su acompañamiento y cariño en los buenos y difíciles momentos en mi vida, y su apoyo en el curso de mi carrera.

Mi novio por su amor, compañía, apoyo, confianza, paciencia y comprensión durante el desarrollo de este proyecto.

El profesor y guía Oscar Marino Mosquera Martínez, por su orientación, acompañamiento, confianza y apoyo en el desarrollo de este proyecto y por darme la grandiosa oportunidad de realizar la pasantía en la Universidad Federal de Alagoas.

Mi amiga, compañera de clase, de laboratorio, de viaje, de apartamento y, actualmente, de trabajo por su amistad, confianza y apoyo.

Mis amigas Katherine, Paola y Lina por su amistad, compañía, tardes de estudio y apoyo durante nuestro tránsito por la universidad.

El profesor Román Ramírez por sus enseñanzas que fueron de gran apoyo para el desarrollo de este proyecto, por su colaboración a través de múltiples videollamadas para realizar consultas y por su ayuda en la revisión de este trabajo.

La profesora Norma Patricia Durán por su colaboración en la realización de los análisis estadísticos.

La oficina de relaciones internacionales de la Universidad Tecnológica de Pereira por el apoyo económico otorgado para la realización de la pasantía en Brasil.

Todas aquellas personas que de una u otra manera aportaron a mi desarrollo profesional y personal con su amistad, orientación y colaboración.

Agradecimientos especiais a:

O professor Euzebio e à professora Marília pela sua recepção e acolhida em Maceió, seu carinho e apoio durante a minha estância no Brasil foram fundamentais para o desenvolvimento deste projeto. Foi grato conhecer pessoas tão maravilhosas como vocês.

Rosalba Rodríguez, minha mãe venezuelana, por virar em pouco tempo uma grande amiga, seu apoio, acompanhamento e amizade durante a estância em Maceió foram de muita ajuda para sentir menos saudades de casa.

Aldenir Feitosa pelo seu apoio e acompanhamento no laboratório e pela sua importante colaboração no desenvolvimento deste projeto.

Luana Santos pela sua cooperação durante a avaliação da atividade antibacteriana, por tomar o tempo de acompanhar os ensaios e seu posterior apoio na realização deste trabalho.

Karlos Lisboa pelo seu acompanhamento, colaboração e apoio na avaliação da atividade larvícida.

O meu amigo Aldy Santos pelo acompanhamento em Maceió, pela sua constante preocupação e ajuda.

Daniel, Sandyane, Nadia, Paulo, Carla, Lusitaneu, Adilson, Pedro, Mariana, Ingrid, Kelly, Merybeth, Andrea, Thyago, João, Henrique, Renata, Aryana, Danni, Kirley e tudo o pessoal do Laboratorio de Pesquisa em Recursos Naturais, pela amável recepção, acolhida e amizade porque o laboratório mesmo foi um lar em Maceió e todos viraram uma família no tempo que eu estive longe de casa.

Elizangela pela sua ajuda no Hospital Geral Do Estado.

Edgar, Eliane, Paulo e Upendra pela sua amizade e acompanhamento durante o tempo que a gente fez parte do Residencial Sol.

Camila, Orlando, Marília e Kelly pela sua gentileza no laboratório da eletroquímica.

¡Obrigada Maceió!

1. MARCO TEÓRICO

1.1. BACTERIA E INFECCIÓN, ANTIBACTERIANO Y RESISTENCIA MICROBIANA

1.1.1. Características de las bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares procariotas que se reproducen de forma binaria. En su exterior poseen una pared celular rígida que rodea la membrana citoplasmática y cuya función es proteger la bacteria de daño mecánico. La membrana citoplasmática no contribuye significativamente al mantenimiento de la forma de la bacteria, sin embargo, es indispensable para la vida bacteriana en cuanto permite el transporte selectivo de sustancias requeridas por la célula pero también transporta productos de desecho hacia el exterior y juega un papel importante en la respiración. Internamente se encuentran el citoplasma, el cual contiene gran cantidad de enzimas, ribosomas y gránulos, y la región nuclear constituida por un solo cromosoma circular. Posee frecuentemente ADN extracromosómico en forma de plásmidos. Pueden encontrarse estructuras accesorias como la cápsula, que es una capa mucoide que rodea a la célula, los flagelos, los cuales permiten la movilidad, y los pili, que cumplen funciones diversas (García, 2004).

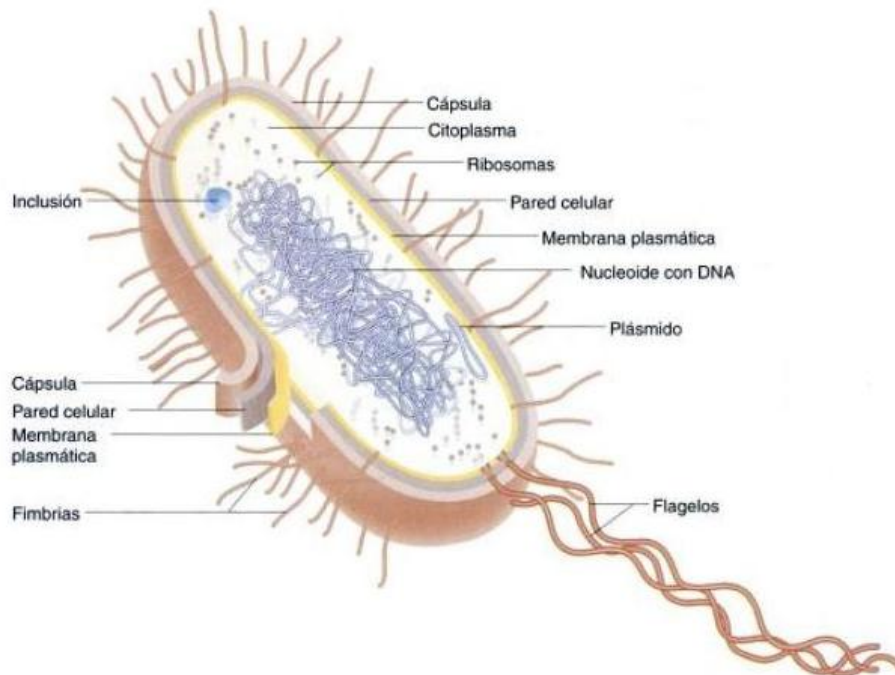


Figura 1. Estructura de una célula bacteriana. (Tortora, et al., 2007)

Las bacterias se relacionan con los seres humanos como constituyentes de la flora normal de la piel y de las mucosas digestiva, respiratoria y urogenital o como patógenos, potenciales o reales, causantes de enfermedades infecciosas (Martín Álvarez y Pachón Díaz, 2006).

1.1.2. Infección y enfermedad infecciosa

Se denomina *infección* a la presencia y multiplicación de microorganismos en los tejidos del hospedador, entendiéndose éste como una persona o cualquier otro animal vivo que, en condiciones naturales, proporciona alojamiento o subsistencia a un agente infeccioso; ahora bien, la respuesta del hospedador a la infección es muy variable y depende de las interacciones de muchos factores propios del hospedador y del agente infeccioso tales como, factores virulentos del microorganismo, la capacidad inmune y no inmune del hospedador para defenderse y su susceptibilidad genética. Puede oscilar desde la simple colonización de un epitelio, al cual los microorganismos se han adherido y en donde se reproducen sin producir daño ni síntomas, hasta enfermedad manifiesta (Ausina Ruiz y Prats Pastor, 2006) (Restrepo, et al., 2003; Ausina Ruiz, et al., 2006).

La *enfermedad infecciosa* es, pues, la expresión clínica de la infección e indica que los microorganismos no solo están presentes y se multiplican en los tejidos, sino que además provocan en el hospedador alguna perturbación, de modo que aparecen signos y síntomas de enfermedad. Producen alteraciones macroscópicas y microscópicas en los órganos y tejidos y desencadenan la activación de los mecanismos de defensa del hospedador, como la migración de leucocitos polimorfonucleares al lugar de la infección y la formación de anticuerpos (Ausina Ruiz, et al., 2006; Ausina Ruiz y Prats Pastor, 2006).

Las enfermedades infecciosas constituyen la primera causa de muerte en el mundo y siguen produciéndose cambios en ellas que justifican su importancia y el interés que despiertan. Entre estos cambios se incluyen el mayor número de personas susceptibles de adquirir infecciones, el aumento de la infección nosocomial y el desarrollo de mecanismos de resistencia por microorganismos frecuentes que inutilizan los antimicrobianos habitualmente empleados para el tratamiento de las infecciones que causan. Tanto las enfermedades transmisibles como la resistencia antibiótica son una prioridad global. De los 12 millones de muertos anuales atribuibles a enfermedades infecciosas, el 95% ocurre en países de renta baja, particularmente en las áreas más pobres (Ausina Ruiz, et al., 2006).

En la tabla 1 se presentan las características generales y las enfermedades producidas por las bacterias usadas en el bioensayo de actividad antibacteriana.

Tabla 1. Características generales y enfermedades producidas por las bacterias estudiadas (Madigan, et al., 2003) (Singh, 2010).

Bacteria		Características generales	Enfermedad producida
Familia: <i>Micrococcaceae</i>	Nombre: <i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos Grampositivos No esporulados Anaerobios facultativos Catalasa positivos	Asociado con patologías como forúnculos, neumonía, osteomielitis, septicemia, meningitis, otitis externa, artritis, endocarditis, intoxicación alimenticia y síndrome de choque tóxico.
Familia: <i>Pseudomonadaceae</i>	Nombre: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilos rectos o curvados Gramnegativos No esporulados Aerobios no fermentativos Flagelos polares	Patógeno oportunista asociado a infecciones nosocomiales, usualmente envuelto en infecciones de tejido blando, infecciones de tracto urinario y neumonía.
Familia: <i>Enterobacteriaceae</i>	Nombre: <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacilos Gramnegativos No esporulados Anaerobios facultativos Inmóviles	Patógeno oportunista causante de cuadros neumónicos, también puede causar enteritis y meningitis (en lactantes) infecciones en las vías urinarias (niños y adultos) y septicemia.
	Nombre: <i>Escherichia coli</i>	Bacilos rectos Gramnegativos No esporulados Anaerobios facultativos	Causa más común de infección en vías urinarias. También se asocia a meningitis neonatal.
Familia: <i>Neisseriaceae</i>	Nombre: <i>Acinetobacter baumannii</i>	Coco-bacilos Gramnegativos No esporulados Aerobios estrictos Encapsulados Inmóviles	Patógeno oportunista asociado con infecciones nosocomiales.

1.1.3. Compuestos antimicrobianos

Los medicamentos antibacterianos son sustancias con actividad antimicrobiana, muchas de las cuales pueden ser utilizadas como agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de enfermedades infecciosas, debiendo reunir las siguientes características: poseer acción antimicrobiana, ser activo sobre los microorganismos en concentraciones bajas y tener una toxicidad mínima para el hospedador (Mirelis Otero y Gurgui Ferrer, 2006).

Los antimicrobianos ejercen su acción de forma específica sobre algunas estructuras o funciones microbianas: Sobre la pared bacteriana inhibiendo su síntesis, sobre la membrana citoplasmática alterando su permeabilidad, inhibiendo la síntesis de proteínas o la síntesis de ácidos nucleicos (Mirelis Otero y Gurgui Ferrer, 2006).

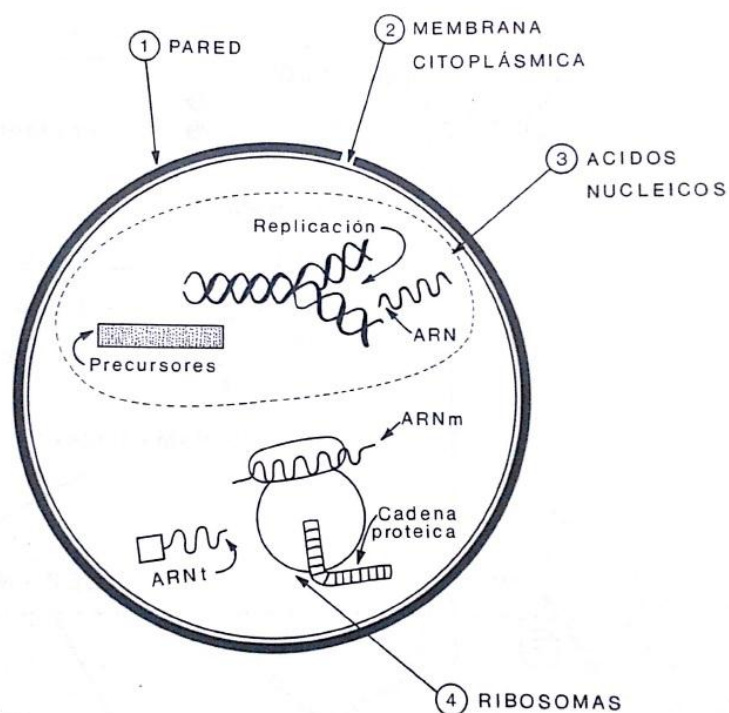


Figura 2. Representación de los puntos de acción de los antimicrobianos (Pumarola, 1991)

Existen agentes antimicrobianos de tipo bacteriostático y bactericida, el primero, inhibe el crecimiento y la multiplicación de la bacteria. Sin embargo, si el agente es removido, las células una vez más se multiplican. Los agentes bactericidas, no solo inhiben el crecimiento de las células sino que también desencadenan una serie de pasos dentro de la célula que conducen a la muerte celular (Cavalieri, 2005).

Los antibióticos se introdujeron en el arsenal terapéutico a principio de la década de los cuarenta del siglo pasado. El uso y el abuso de estos fármacos han contribuido de manera eficaz a la aparición de nuevos mecanismos de resistencia y al incremento constante de sus tasas. En la actualidad ningún antibiótico o familia de antimicrobianos conocidos por el

hombre escapa a los mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias, y son cada vez más abundantes los ejemplos de bacterias que son resistentes a varios antibióticos (bacterias multirresistentes). El desarrollo de resistencia a los antimicrobianos en las bacterias causantes de infecciones es un tema de gran importancia por varias razones, entre las que se encuentran la dificultad de su tratamiento, el aumento del coste sanitario derivado de ello y, en algunos tipos de infecciones, el aumento de mortalidad (Ausina Ruiz, et al., 2006; Martín Álvarez y Pachón Díaz, 2006).

1.1.4. Resistencia microbiana

Se denomina resistencia a la disminución o ausencia de sensibilidad de una cepa bacteriana a un antibiótico determinado, por lo tanto, una cepa bacteriana se considera resistente a un antibacteriano cuando su crecimiento sólo se inhibe con concentraciones superiores a las que se alcanzan en el lugar de la infección. Existe una resistencia natural o intrínseca, que es una característica inherente a la gran mayoría de las cepas que constituyen un grupo, género o especie bacteriana, esta resistencia se encuentra asociada a una vía de biosíntesis natural presente en el microorganismo, por ejemplo, la resistencia de la mayoría de las bacterias gramnegativas a la vancomicina. Por otro lado, se tiene una resistencia adquirida, que se produce cuando una cepa de una especie que es naturalmente sensible a un antimicrobiano de pronto se vuelve resistente a este mismo antibiótico. A diferencia de la intrínseca, la resistencia adquirida puede asociarse a sólo alguna cepa de un grupo o especie de un microorganismo determinado. La presencia de este tipo de resistencia en clínica es impredecible. Esta resistencia puede ser debida a una mutación cromosómica o a la adquisición de genes de otros microorganismos por mecanismos de transferencia (Mirelis Otero y Gurgui Ferrer, 2006).

1.1.5. Mecanismos de resistencia microbiana adquirida

Los mecanismos de resistencia adquirida son muchos y variados en función del antimicrobiano al que confieren resistencia. Se pueden clasificar en cuatro grupos (Navarro Risueño, et al., 2006):

1. Producción de enzimas que inactivan o modifican a un antimicrobiano. Entre las enzimas inactivantes se encuentran las β -lactamasas, las acetiltransferasas de grupos acetilo, adenilo y fosforilo.
2. Alteración de la penetración del antimicrobiano a través de las envolturas bacterianas, permeabilidad, bloqueo del mecanismo de entrada o bombeo activo del antimicrobiano. Estos mecanismos tienen en común que impiden al antibiótico llegar al punto diana.
3. Alteraciones en el sustrato o blanco de acción del antimicrobiano. Cuando se modifican los puntos diana de los antimicrobianos, el antibiótico no reconoce su sustrato, no se fija y, por lo tanto, no puede ejercer su acción.
4. Vías metabólicas alternativas. La resistencia a las sulfamidas y a la trimetoprima son dos ejemplos de este mecanismo, que consiste en la adquisición por parte del

microorganismo resistente de una nueva enzima sin afinidad por el antibiótico y que realiza las funciones de la enzima natural.

Por último, podría considerarse un quinto grupo en el que se englobarían otros mecanismos. Dentro de este grupo se describen las resistencias debidas a la producción de una enzima determinada que, aunque está presente en todas las cepas de una especie determinada, sólo algunas de ellas pueden adquirir la capacidad de hiperproducirla o la inducción por parte de un antimicrobiano, o incluso de otras sustancias sin actividad antimicrobiana, de la expresión de uno o varios genes que comportarían la resistencia a uno o varios antimicrobianos (Navarro Risueño, et al., 2006).

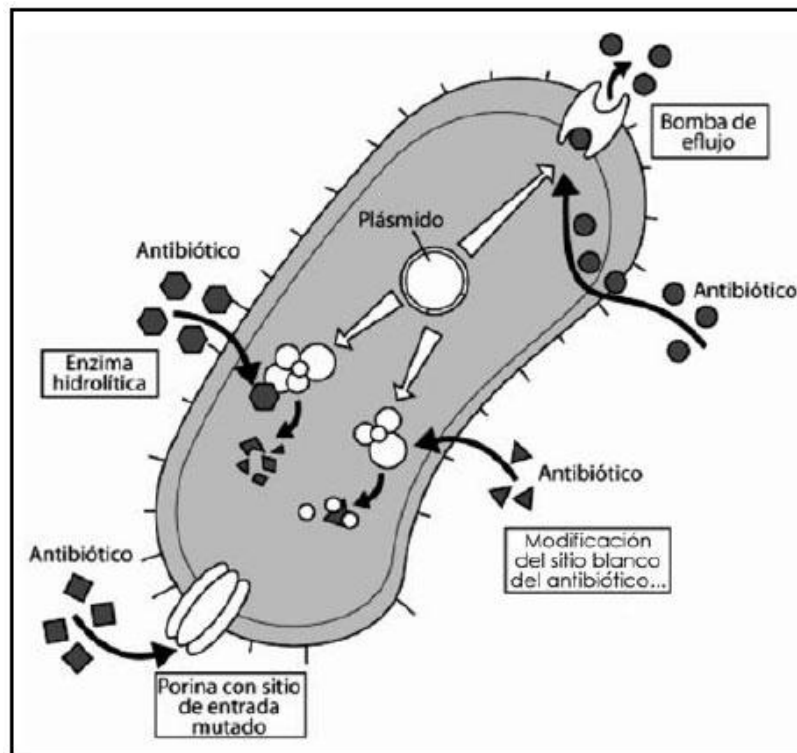


Figura 3. Mecanismos de resistencia bacteriana (Moreno M, et al., 2009).

Entre los factores que influyen en la aparición de la resistencia a los antimicrobianos está la progresiva evasión de la investigación farmacéutica en el campo de las enfermedades infecciosas, con el resultado de un muy bajo nivel de innovación de terapia antimicrobiana. La reiteración durante muchos años del uso de las mismas familias de antibióticos podría provocar la pérdida de su actividad. Por el contrario, la aparición de nuevos fármacos, no relacionados con aquellos ya en uso, podría eventualmente reducir la proporción de cepas resistentes. La lucha contra la resistencia requiere investigación constante, y es responsabilidad tanto de los científicos como de la sociedad asegurar las medidas que puedan garantizar los niveles requeridos de innovación en terapia antimicrobiana (Cantón Moreno, et al., 2006).

1.1.6. Métodos para la determinación de actividad antibacteriana

Las metodologías para la determinación de la actividad antibacteriana de extractos vegetales se pueden clasificar en tres grupos principales: Métodos de difusión, métodos de dilución y bioautografía.

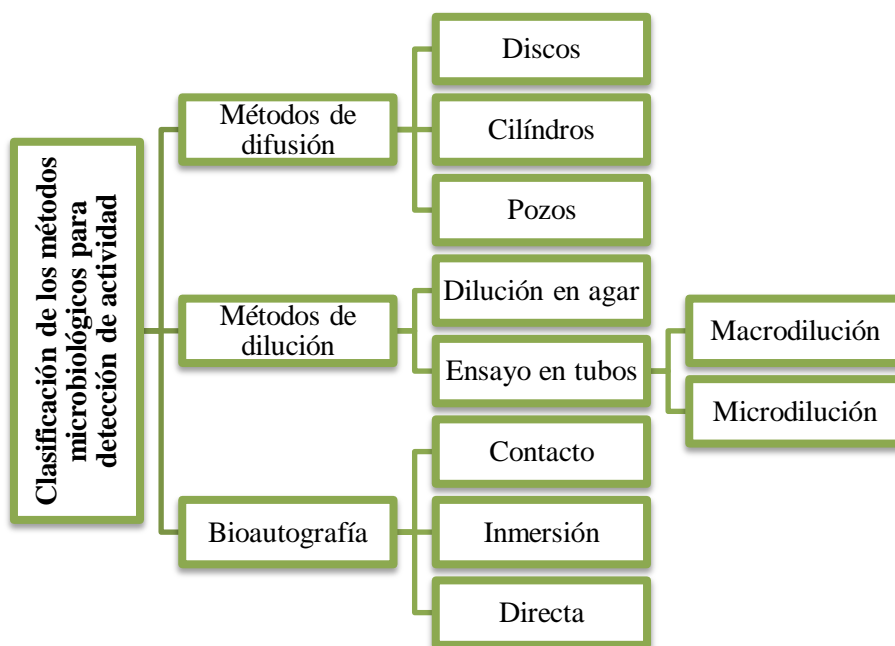


Figura 4. Clasificación de los métodos microbiológicos para detección de actividad. (Choma y Grzelak, 2011)

Los métodos de difusión son usados con frecuencia en ensayos de susceptibilidad antimicrobiana de sustancias puras, preferiblemente polares. (Choma y Grzelak, 2011). Estos métodos no permiten determinar la concentración mínima inhibitoria puesto que no es posible medir con exactitud la cantidad de sustancia que se difundió en el agar.

Los métodos de dilución se aplican a extractos complejos, sustancias puras y para muestras polares y no polares. Son usados comúnmente para la determinación de CMI y CMB, puesto que existe la posibilidad de estimar la concentración del compuesto de ensayo en el medio de cultivo (Choma y Grzelak, 2011).

Los métodos bioautográficos pueden considerarse similares a los métodos de difusión en agar, la diferencia radica en que los compuestos de ensayo permanecen adsorbidos en una placa de cromatografía delgada. Esta metodología puede considerarse como un fraccionamiento bioguiado de la matriz, al permitir simultáneamente la identificación de familias fitoquímicas presentes en el extracto a través de cromatografía y, así, la naturaleza de los compuestos activos (Ramirez y Marin, 2009).

celular, la regulación del crecimiento celular, la síntesis de componentes biológicos importantes y el metabolismo de xenobióticos (Londoño, 2012).

1.2.2. Estrés oxidativo

La exposición a radicales libres de diversas fuentes ha causado que los organismos desarrollen una serie de mecanismos de defensa que incluyen: 1) remoción catalítica de radicales libres por enzimas como catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), 2) unión de proteínas a metales prooxidantes como hierro y cobre (transferrina, ceruloplasmina), 3) protección contra daño, como las proteínas de choque térmico y 4) estabilización de radicales libres con donadores de protones o electrones como glutatión (GSH), vitamina E (tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), bilirrubina y ácido úrico (Londoño, 2012).

Sin embargo, cuando el aumento del contenido intracelular de ERO sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula se produce el *estrés oxidativo*, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

1.2.3. Enfermedades asociadas a las especies reactivas de oxígeno

A pesar de que la célula posee valiosos mecanismos antioxidantes y reparadores que suponen una defensa eficiente frente a la agresión oxidativa, en determinadas ocasiones no son suficientes y el daño oxidativo permanece como un resultado imposible de evitar de la existencia aerobia. El estrés oxidativo se encuentra involucrado en una amplia variedad de procesos degenerativos, enfermedades y síndromes tales como:

- Mutagénesis, transformación celular y cáncer
- Arteriosclerosis
- Infartos y lesiones derivadas de la isquemia/reperfusión
- Enfermedades crónicas inflamatorias (artritis reumatoide, lupus eritematosus, artritis psoriatica)
- Problemas agudos inflamatorios, cicatrización de heridas
- Estrés fotooxidativo ocular
- Alteraciones del sistema nervioso central (esclerosis lateral amiotrofica, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer) y
- Una amplia variedad de alteraciones relacionadas con la edad, incluyendo los mismos procesos del envejecimiento (Boticario y Cascales, 2009).

1.2.4. Compuestos antioxidantes

Halliwell y Gutteridge (1989) definieron un antioxidante como “cualquier sustancia que, cuando está presente en concentraciones bajas en comparación con la de un sustrato oxidable, retrasa significativamente o inhibe la oxidación de dicho sustrato”. Se

caracterizan por ser muy heterogéneos, pueden ser hidrosolubles y liposolubles, localizarse intra y extracelularmente, y proceder de diferentes fuentes ya que algunos son nutrientes o proceden de éstos y otros son productos del metabolismo.

Los antioxidantes pueden actuar:

- i. Previniendo la formación de ERO.
- ii. Interceptando el ataque de ERO.
- iii. Secuestrando los metabolitos reactivos y convirtiéndolos en moléculas menos reactivas.
- iv. Facilitando la reparación del daño causado por ERO.
- v. Manteniendo un ambiente favorable para la actuación de otros antioxidantes.
- vi. Amplificando la resistencia de las dianas biológicas sensibles al ataque de ERO (Avello y Suwalsky, 2006).

Según el modo de acción, los antioxidantes se clasifican en primarios, secundarios o terciarios:

1. Los primarios impiden la formación de radicales libres, detienen la reacción en cadena de los radicales libres o son quelantes de metales de transición. Se comportan como captadores de ERO. Dentro de este grupo se encuentran las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPX).
2. Los secundarios capturan los radicales interrumpiendo las reacciones en cadena o desplazan las especies reactivas del oxígeno, ejemplo de ellos son el ácido ascórbico, ácido úrico, bilirrubina, albúmina, α -tocoferol, los carotenoides y el glutatión.
3. Los terciarios se encargan de reparar el daño causado a las moléculas por los radicales libres o eliminan aquellas que se han dañado (Avello y Suwalsky, 2006).

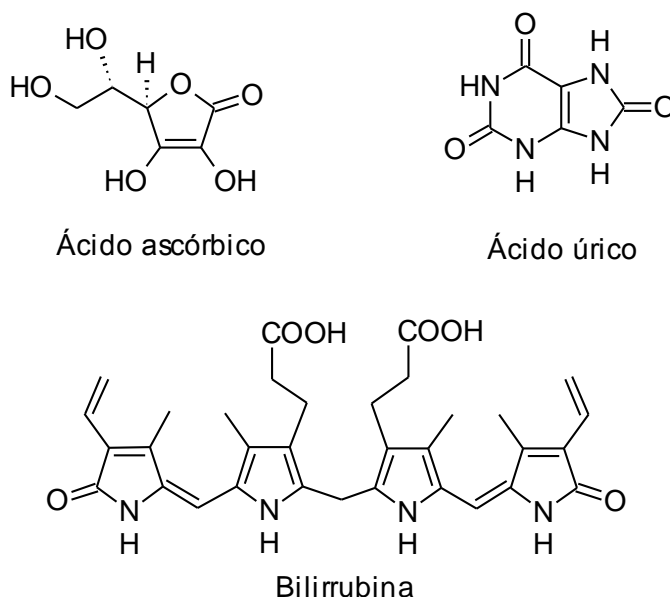


Figura 6. Estructuras químicas de algunos antioxidantes secundarios.

1.2.5. Métodos para determinar actividad antioxidante

La actividad antioxidante no se puede medir directamente, si no por los efectos del antioxidante en el control de la oxidación. Las características de una oxidación son un sustrato, un oxidante, un iniciador, intermediarios y los productos finales, y la medición de cualquiera de ellos puede usarse para la evaluación de la actividad antioxidante (Antolovich, et al., 2002).

Huang et. al., 2005 clasifican los principales ensayos *in vitro* para determinar la capacidad antioxidante en dos categorías: Ensayos que envuelven reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno y ensayos que envuelven reacciones de transferencia de electrones, de esta manera se presentan en la tabla 2. Los ensayos basados en la transferencia de electrones (ET) miden la capacidad reductora del antioxidante y los ensayos basados en la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) cuantifican la capacidad del antioxidante de donar átomos de hidrógeno (Huang, et al., 2005).

Tabla 2. Ensayos de capacidad antioxidante *In vitro* (Huang, et al., 2005).

Ensayos que envuelven reacciones de transferencia de átomos de hidrógeno $\text{ROO}\cdot + \text{AH} \rightarrow \text{ROOH} + \text{A}\cdot$	Capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC)
	Parámetro antioxidante de captura de radicales (TRAP)
	Inhibición de la oxidación del ácido linoléico
	Inhibición de la oxidación de lípidos de baja densidad, LDL
Ensayos que envuelven reacciones de transferencia de electrones $\text{M}(\text{n}) + \text{e}^- \rightarrow \text{AH}\cdot^+ + \text{M}(\text{n}-1)$	Capacidad antioxidante equivalente Trolox (TEAC)
	Capacidad para reducir el hierro férrico (FRAP)
	Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico (ABTS \cdot^+)
	Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH \cdot)
	Capacidad de reducción de cobre (II)
	Ensayo de Folin-Ciocalteu

1.2.6. Ensayo de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH \cdot

Recientemente, el ensayo del radical DPPH \cdot se ha vuelto muy popular en los estudios de antioxidantes naturales, puesto que el método es simple y altamente sensible (Moon y Shibamoto, 2009), además ha demostrado ser independiente de la polaridad del sustrato (Koleva, et al., 2002). Entre los métodos que emplean radicales libres, el ensayo con DPPH \cdot se considera representativo dada su estabilidad debido a la deslocalización del electrón desapareado (Mosquera M., et al., 2005). El ensayo se basa en la teoría de que un donador de átomos de hidrógeno es un antioxidante y el efecto de éste es proporcional a la desaparición de la coloración rosa del DPPH. Varios métodos son usados para medir la cantidad de DPPH \cdot en el sistema de ensayo, sin embargo, el monitoreo con espectrofotómetro UV recientemente se ha convertido en el más amplio y común método de medición dada la simplicidad y precisión (Moon y Shibamoto, 2009).

El fundamento del método desarrollado por (Brand-Williams, et al., 1995) consiste en que el radical DPPH[•] posee un electrón desapareado y tiene una coloración rosa en solución, caracterizada por una banda de absorción alrededor de 520 nm, cuando la solución de DPPH[•] entra en contacto con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno se produce la forma reducida DPPH-H (α,α -diphenyl- β -picrylhydrazine) con la consecuente pérdida del color y por lo tanto una disminución en la absorbancia a la misma longitud de onda (Muñoz Juárez y Gutiérrez, 2008).

En la figura 7 se muestra la reacción química que media la reducción del radical DPPH[•] en presencia de un compuesto antioxidante donador de hidrógeno (Koleva, et al., 2002).

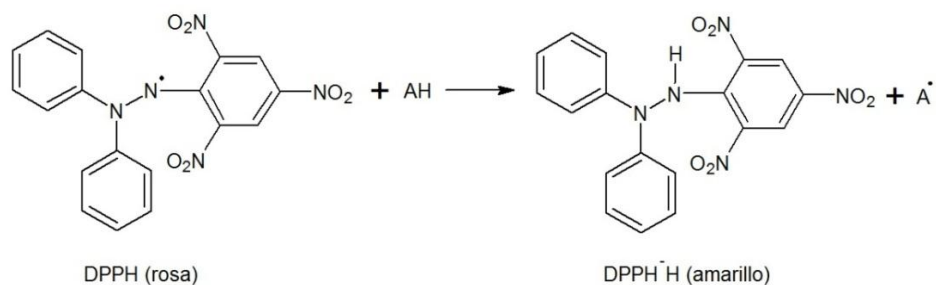


Figura 7. Reacción del radical DPPH[•] con un compuesto antioxidante.

Los resultados del método DPPH se han presentado de varias maneras, como porcentaje de inhibición del radical (Samarth, et al., 2008), porcentaje de actividad antioxidante (Mensor, et al., 2001), equivalente Trolox (Moon y Shibamoto, 2009), EC₅₀ (Brand-Williams, et al., 1995), entre otros. El EC₅₀ es la cantidad de antioxidante necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH un 50%, este parámetro es calculado graficando el % de decoloración de DPPH o % de actividad antioxidante contra la concentración del extracto.

1.3. *Aedes Aegypti* (LINNAEUS, 1762)

1.3.1. Características generales de *Aedes aegypti*

Aedes Aegypti es uno de los vectores más eficientes para los arbovirus, debido a que es muy antropofílico, frecuentemente pica varias veces antes de completar la ovogénesis y prolifera en estrecha proximidad a los seres humanos. Varios factores pueden influir en la dinámica de la transmisión del virus, incluidos factores ambientales y climáticos, interacciones entre huéspedes y patógenos, y factores inmunológicos de la población. El clima influye directamente en la biología de los vectores y, por esa razón, su abundancia y distribución; consiguientemente, es un factor determinante en la epidemia de enfermedades transmitidas por vectores (OMS, 2010).

El origen del mosquito *Aedes aegypti* se ubica en la región etiópica, que nuclea la mayor cantidad de especies del subgénero *Stegomyia* (Theobald, 1901), al cual este culicido pertenece. Actualmente, es una especie diseminada por el hombre por medio del transporte

de sus adultos, huevos, larvas o ninfas en barcos, aviones y transportes terrestres, lo que lo ha llevado a constituirse en un mosquito cosmopolita (Salvatella, 1996).

Sus hábitos son netamente antropófilos y domésticos, con radicación de criaderos en la vivienda o su peridomicilio. Establece sus criaderos en agua limpia, con bajo tenor orgánico y de sales disueltas, mediante la puesta de huevos en la superficie del recipiente a la altura de la interfase agua-aire (Salvatella, 1996).

Los huevos miden menos de 1 mm de largo y son inicialmente de color blanco, para tornarse negros con el desarrollo del embrión, que evoluciona en 2 a 3 días, bajo óptimas condiciones de temperatura y humedad. Después de ese período, los huevos son capaces de resistir desecación y temperaturas extremas con sobrevivencias de siete meses a un año. Las larvas que emergen inician un ciclo de cuatro estados larvarios, creciendo a lo largo de tres mudas desde un largo de 1 mm a los 6 o 7 mm finales. El paso de un estadio larval a otro se lleva a cabo por muda en la que abandona su exoesqueleto, manteniéndose protegida por una nueva cubierta del cuerpo que se formó previamente, esto permite el aumento de su tamaño. Su desarrollo se completa en condiciones favorables de nutrición y con temperaturas de 25°C a 29°C, en 5 a 7 días, estando dotadas de movimientos característicos verticales, entre fondo y superficie, disponiéndose en forma de ese (S) durante los mismos. La pupa no requiere alimentación y a una temperatura entre 28° y 32°C, completa su desarrollo hasta la emergencia del adulto en 1 a 3 días. El ciclo completo de *Aedes aegypti*, de huevo a adulto, se completa en óptimas condiciones de temperatura y alimentación, en 10 días. El adulto emergente es un mosquito de color negro, con diseños blanco-plateados formados por escamas claras en el dorso del tórax, y mostrando un anillado característico a nivel de tarsos, tibia y fémures de las patas (figura 8) (Salvatella, 1996). Las hembras son las que se alimentan de sangre (hematófagas) ya que necesitan de la hemoglobina como fuente protéica para la oviposición (OPS/OMS, 2011).

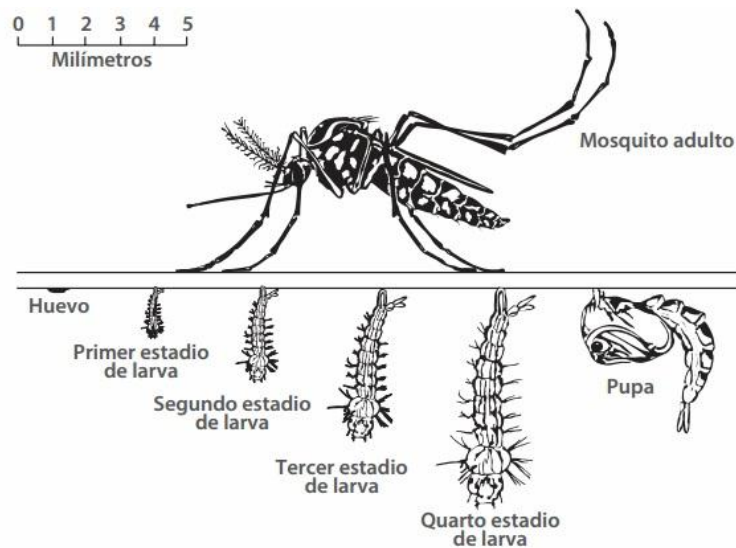


Figura 8. Ciclo larvario del mosquito *Aedes aegypti* (Rojas, 2007).

1.3.2. Virus del dengue

El virus del dengue, DENV, pertenece al serocomplejo dengue, género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*. Este serocomplejo está conformado por cuatro serotipos denominados DENV1 a DENV4. Los cuatro serotipos circulan periódicamente en áreas endémicas e hiperendémicas y, sin distinción alguna, todos causan la enfermedad conocida como dengue. Cuando una persona se recupera de la infección adquiere inmunidad de por vida contra el serotipo en particular. Sin embargo, la inmunidad cruzada a los otros serotipos es parcial y temporal. Las infecciones posteriores causadas por otros serotipos aumentan el riesgo de padecer el dengue grave (Velandia y Castellanos, 2011) (WHO, 2012).

El DENV es transmitido por mosquitos hembra del género *Aedes* (especies *aegypti* y *albopictus*), distribuidos actualmente en todos los países tropicales y subtropicales del mundo. La circulación del DENV entre humanos y mosquitos se presenta cuando el mosquito se alimenta con la sangre de un individuo virémico. Así, el mosquito, al ingerir sangre humana infectada, favorece la infección de las células epiteliales de su intestino; luego, las partículas virales producidas en estas células, son liberadas al hemocele y hacia algunos órganos del mosquito, como las glándulas salivares, las cuales se convierten en órganos reservorios para el virus. La infección en el humano se presenta cuando este mosquito infectado pica nuevamente para alimentarse, liberando saliva y virus (Velandia y Castellanos, 2011).

El dengue se presenta en todas las regiones tropicales y subtropicales del planeta. En años recientes, la transmisión ha aumentado de manera predominante en zonas urbanas y semiurbanas y se ha convertido en un importante problema de salud pública. El dengue grave (conocido anteriormente como dengue hemorrágico) fue identificado por vez primera en los años cincuenta del siglo pasado durante una epidemia de la enfermedad en Filipinas y Tailandia. Hoy en día, afecta a la mayor parte de los países de Asia y América Latina y se ha convertido en una de las causas principales de hospitalización y muerte en los niños de dichas regiones (WHO, 2012).

En las últimas décadas ha aumentado enormemente la incidencia de dengue en el mundo. Más de 2500 millones de personas —más del 40% de la población mundial— están en riesgo de contraer el dengue. La OMS calcula que cada año se producen entre 50 millones y 100 millones de infecciones por el virus del dengue en el mundo (WHO, 2012).

1.3.3. Virus de la fiebre amarilla

El virus de la fiebre amarilla es un arbovirus del género *Flavivirus*, es un virus pequeño de 40 a 60 nm, con envoltura, capaz de replicarse en el citoplasma de las células infectadas. Existe sólo un serotipo que es antigénicamente conservado (Abarca V, et al., 2001).

La fiebre amarilla es una zoonosis propia de algunas regiones tropicales de América del Sur y África, que a través del tiempo ha causado numerosas epidemias con elevadas tasas de mortalidad (Bureau, 1981).

Existe una forma selvática de la enfermedad transmitida por mosquitos (*Haemagogus janimomys*, *Sabettes*), que viven en las copas de los árboles desde donde mantienen el ciclo con los primates que allí habitan (mico aullador o mono cotudo y marta); sin embargo, esos mosquitos pueden infectar a los humanos que llegan hasta esos lugares selváticos, como desplazados o colonos, y talan los árboles que constituyen el nicho inicial del mosquito (Rodríguez, 2003).

Si una persona ha adquirido el virus en esa forma, una vez se desplaza a las zonas urbanas, puede ser picado por el *Aedes aegypti* e iniciar el ciclo urbano de la enfermedad que en un momento dado puede dar lugar a una epidemia (Rojas, 2007).

Hay 45 países endémicos en África y América Latina con un total de 900 millones de habitantes en riesgo. En África hay 32 países en riesgo, con una población estimada de 508 millones de habitantes. El resto de la población en riesgo se encuentra en 13 países latinoamericanos, entre los que destacan por su mayor riesgo Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador y Perú (OMS, 2011).

Se calcula que cada año se producen en el mundo 200.000 casos de fiebre amarilla, de los cuales 30.000 son mortales. En países libres de fiebre amarilla se produce un pequeño número de casos importados (OMS, 2011).

1.3.4. Control vectorial de *Aedes aegypti*

Puesto el mosquito *Aedes aegypti* es un importante vector de arbovirus, la prevención o reducción de la transmisión de estos depende enteramente del control de los mosquitos vectores o la interrupción del contacto humano-vector (OMS, 2010).

El control de *Aedes aegypti* se logra principalmente eliminando los recipientes que son hábitats favorables para la oviposición y que permiten el desarrollo de las etapas acuáticas. Los hábitats se eliminan evitando el acceso de los mosquitos a estos recipientes o vaciándolos y limpiándolos con frecuencia, eliminando las etapas evolutivas con el uso de insecticidas o agentes de control biológico, eliminando con insecticidas los mosquitos adultos o mediante las combinaciones de estos métodos (OPS/OMS, 2011).

A pesar de que los químicos se utilizan ampliamente para tratar los hábitats de larvas de *Ae. aegypti*, el uso de larvicidas se considera un método complementario al manejo ambiental y debe restringirse a los recipientes que no se pueden eliminar ni manejar de otra forma. Debido a que *Ae. aegypti* frecuentemente deposita los huevos en recipientes para almacenar agua, los larvicidas deben tener una baja toxicidad para otras especies y no deben cambiar significativamente el sabor, olor ni color del agua (OMS, 2010).

Según la OMS, los larvicidas de mosquitos apropiados para su aplicación en recipientes de agua impotable, son: metil pirimifos, temefos, diflubenzuron, rs-metopreno, novaluron, piriproxifen, *Bacillus thuringiensis israelensis* y spinosad. Para el tratamiento de agua potable, se pueden aplicar temefos y metopreno en dosis de hasta 1 ppm; se puede aplicar piriproxifeno en dosis de hasta 0.01 ppm (OMS, 2010).

La finalidad principal de la mayoría de los programas de la OMS es reducir las densidades de las poblaciones del vector tanto como sea posible y mantenerlas en niveles bajos. Por lo que, la investigación operativa debe incluir, por ejemplo, estudios sobre la ecología del vector, la eficacia, efectividad y rentabilidad de los métodos actuales y los prometedores nuevos métodos para el control de vectores (OMS, 2010).

1.4. GENERALIDADES DE LAS FAMILIAS BOTÁNICAS *SOLANACEAE, PIPERACEAE Y EUPHORBIACEAE*

1.4.1. Familia *Solanaceae*

Las solanáceas (*Solanaceae*) constituyen una familia cosmopolita muy bien representada en las zonas templadas y con dos centros importantes de biodiversidad: Australia y el centro y sur de América. En ella se incluyen poco menos de un centenar de géneros y casi 3000 especies, entre las que se cuentan plantas cultivadas de gran interés para el hombre como la papa, el tomate, los pimientos, el tabaco y la berenjena, todas de origen americano a excepción de la última, nativa del sur de Asia (India). Muchas son ricas en alcaloides, entre los que pueden destacarse los derivados del tropano (como la hiosciamina, atropina y escopolamina), la nicotina y diversos glucoalcaloides esteroídicos (solaninas), de gran importancia desde el punto de vista farmacológico (Izco, 1997).

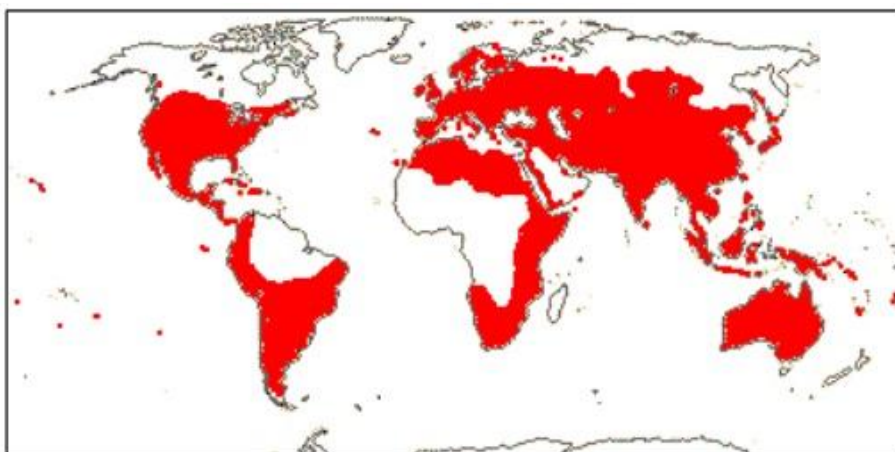


Figura 9. Distribución geográfica de la familia *Solanaceae* (Heywood 1985).

Comprende árboles, arbustos, lianas y plantas herbáceas, a veces epífitas o provistas de espinas, con hojas simples y alternas, enteras o más o menos divididas, carentes de estípulas, y a menudo las de los extremos de las ramas muy aproximadas debido a la concoalescencia de los tallos. Las flores pueden ser solitarias o aparecer reunidas en inflorescencias cimosas generalmente ebracteadas. Son hermafroditas y pentámeras, actinomorfas o con cigomorfia más o menos marcada (Izco, 1997).

Entre los géneros que poseen mayor importancia para el hombre figuran *Solanum*, *Nicotiana*, *Capsicum*, *Atropa* y *Datura*. El primero es riquísimo, pues comprende unas 1500 especies de las zonas templadas y tropicales, con hojas muy ricas en gluco-alcaloides esteroidicos derivados del solanidano y el espirosolana, frecuentemente tóxicos para el hombre y otros mamíferos por su potente acción hemolítica y por su efecto depresor sobre el sistema nervioso y respiratorio, aunque pueden poseer efectos medicinales a pequeñas dosis (Izco, 1997).

1.4.2. Familia *Piperaceae*

La familia *Piperaceae* es de ámbito pantropical, reúne cerca de 2000 especies cuya segregación en géneros es diversa, aunque los géneros *Piper* y *Peperomia* comprenden más del 95% de las especies (Izco, 1997).

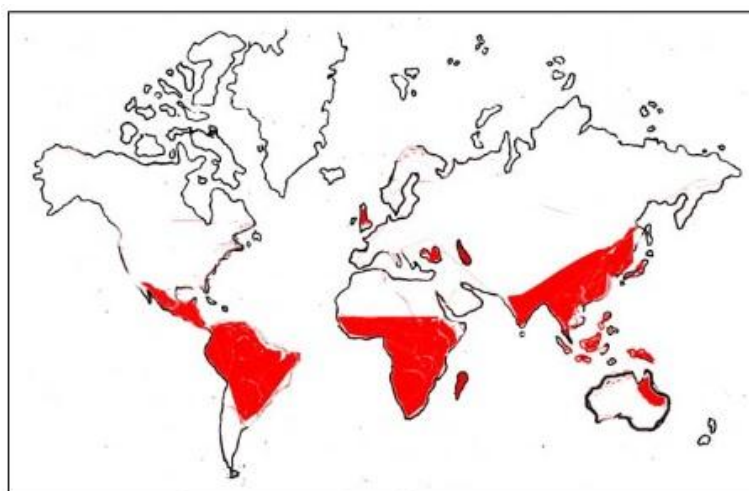


Figura 10. Distribución geográfica de la familia *Piperaceae* (Heywood 1985).

Consisten en arbolillo o arbustos, a veces trepadores, o plantas herbáceas, con hojas alternas provistas o no de estípulas. Sus flores son unisexuales o más generalmente hemafróditas, carecen de perianto y aparecen frecuentemente reunidas en inflorescencia espiciformes muy vistosas. El fruto suele ser una drupa monosperma (*Piper*) o una baya (*Peperomia*), y las semillas presentan endosperma reducido y persisperma muy desarrollado (Izco, 1997).

1.4.3. Familia *Euphorbiaceae*

La familia *Euphorbiaceae* es una familia muy amplia que comprende unos 300 géneros y cerca de 7500 especies, buena parte de ellas tropicales, aunque también poseen una amplia representación en las regiones templadas (Izco, 1997).



Figura 11. Distribución geográfica de la familia *Euphorbiaceae* (Heywood 1985).

Pueden ser árboles, arbustos y plantas herbáceas, anuales o perennes, siendo característica en la mayor parte de ellas la posesión de tubos laticíferos con látex blanco y a menudo irritante, que aflora apenas se causa la herida a la planta. Las hojas pueden ser simples o compuestas, alternas o menos frecuentemente verticiladas u opuestas, aunque en las especies adaptadas a los enclaves más áridos se reducen notablemente, llegando a faltar o a transformar sus estípulas en espinas o glándulas (Izco, 1997).

2. JUSTIFICACIÓN

La importancia de la biodiversidad, así como la adopción de medidas para su conservación, uso sostenible y distribución de beneficios que se deriven de su utilización, se consignan en la Convención sobre Diversidad Biológica, ratificada por Colombia mediante la Ley 165 de 1994. La Política Nacional de Biodiversidad establece un marco general y de largo plazo para orientar las estrategias nacionales sobre este tema, entre ellas, la estrategia del **conocimiento** comprende la caracterización de componentes de la biodiversidad en los niveles ecosistémico, de poblaciones, especies y el nivel genético; y la recuperación del conocimiento y las prácticas tradicionales (MMA, 1996).

Colombia es uno de los países con mayor diversidad biológica, ya que con sólo el 0.7% de la superficie continental posee cerca del 10% de la diversidad biológica mundial. Esta

biodiversidad ha sido utilizada por comunidades tradicionales y es base directa e indirecta de numerosas actividades productivas, por lo cual juega un papel estratégico en el desarrollo nacional, y en las oportunidades futuras de desarrollo sostenible (MMA, 1996).

Respecto a la riqueza botánica colombiana, se calcula que en el mundo existen de 350.000 a 500.000 especies vegetales, de las cuales en Colombia se encuentran entre 35.000 y 50.000; de ellas aproximadamente 5.000 han sido utilizadas por indígenas y campesinos para combatir el amplio espectro de enfermedades a que se ven sometidos. Esto hace que el país tenga un amplio potencial como fuente de nuevos principios activos que pueden ser usados como alternativa terapéutica (Fonnegra y Jiménez, 2007).

Los usos de la biodiversidad en la medicina son vitales para el hombre. Una proporción importante de los remedios utilizados en países como Colombia provienen de extractos de plantas y medicinas sintetizadas a partir de compuestos naturales. Se estima que cerca de 20.000 especies de plantas en el ámbito mundial pueden tener usos tradicionales como medicinas, y tan sólo 5.000 de éstas han sido investigadas para evaluar su potencial farmacéutico. En la actualidad cerca de 120 sustancias químicas utilizadas como fármaco provienen de 90 especies de plantas en el mundo (MMA, 1996).

La búsqueda de actividades biológicas debe estar enfocada a establecer el conocimiento científico-técnico que sirva de soporte al desarrollo de la cadena de valor de las plantas, así pues, con el fin de resaltar la importancia de la biodiversidad colombiana este proyecto se centra en evaluar la actividad antimicrobiana contra cepas bacterianas sensibles y aislados clínicos resistentes, la actividad antioxidante y la actividad larvicida contra *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) de treinta y cuatro extractos metanólicos de algunas especies vegetales encontradas en la ecorregión cafetera colombiana pertenecientes a las familias *Solanaceae*, *Piperaceae* y *Euphorbiaceae*.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antibacteriana, antioxidante y larvicida de los extractos metanólicos de 34 plantas de la ecorregión cafetera colombiana pertenecientes a las familias *Euphorbiaceae*, *Piperaceae* y *Solanaceae*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1** Determinar cuáles extractos metanólicos de plantas de las familias *Euphorbiaceae*, *Piperaceae* y *Solanaceae* presentan actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*,

Klebsiella pneumoniae, *Escherichia coli* y aislados clínicos multirresistentes de *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

3.2.2. Evaluar la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de plantas de las familias *Euphorbiaceae*, *Piperaceae* y *Solanaceae* utilizando como especie radicalaria libre 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

3.2.3. Establecer si los extractos metanólicos de plantas de la familia *Piperaceae* poseen actividad larvica contra *Aedes aegypti* en su cuarto estadio.

4. SECCIÓN EXPERIMENTAL

4.1. MATERIALES

4.1.1. Reactivos

Caldo Mueller-Hinton Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

Bromuro de 3-(4,5-Dimetil-2-thiazolil)-2,5-difenil-2H- tetrazolio (MTT) con pureza del 98% Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

Radical 1,1-Difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH•) Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

Metanol grado analítico Vetec®

Dimetilsulfóxido grado analítico Vetec®

4.1.2. Materiales y equipos

Balanza analítica Mettler Toledo AB265-S/FACT

Micropipeta de volumen variable Digipet

Pipeta multicanal Gilson®

Material de vidrio Schott-Duran

Microplacas TPP®

Thermo Scientific Multiskan® Spectrum

4.1.3. Material vegetal

En la tabla 2 se presentan las 34 especies vegetales pertenecientes a las familias *Solanaceae*, *Piperaceae* y *Euphorbiaceae*, codificadas según el número del voucher FJR de identificación (código del herbario de la Universidad de Antioquia) y el código para la Universidad Tecnológica de Pereira. La parte aérea de las plantas fue recolectada en diferentes sitios de reserva natural de los departamentos de: Caldas, Risaralda y Quindío. En Risaralda: Parque Regional Natural Ucumarí, Alto El Nudo, La Nona y La Marcada. En Caldas: Parque Los Yarumos. En Quindío: Zona de reserva Bremen-La Popa

Tabla 3. Especies vegetales para la evaluación como antibacterianos, larvicidas y antioxidantes.

Familia	Especie	No. FJR	Código UTP
<i>Solanaceae</i>	<i>Solanum acerifolium</i>	3961	120
	<i>Solanum cf umbellatum</i>	3962	121
	<i>Dunalia solanacea</i>	3992	145
	<i>Solanum ovalifolium</i>	4027	173
	<i>Cestrum sp</i>	3978	137
	<i>Browallia speciosa</i>	4025	171
	<i>Deprea aff sachapapa</i>	4024	170
	<i>Solanum brevifolium</i>	4028	174
	<i>Solanum sp</i>	3970	129
	<i>Witheringia coccoloboides</i>	4019	165
	<i>Solanum trachycyphum</i>	4042	188
	<i>Solanum sp</i>	4010	161
	<i>Solandra coriacea</i>	4013	164
	<i>Cestrum humboldtii</i>	4022	168
	<i>Solanum lepidotum</i>	3975	134
	<i>Lycianthes radiata</i>	3993	146
	<i>Solanum sp</i>	4043	189
<i>Piperaceae</i>	<i>Piper pesaresanum</i>	3996	148
	<i>Piper daniel-gonzalezii</i>	4051	197
	<i>Piper glanduligerum</i>	4026	172
	<i>Piper crassinervium</i>	4021	167
	<i>Piper umbellatum</i>	4012	163
	<i>Piper crassinervium</i>	4030	175
	<i>Peperomia acuminata</i>	4002	154
	<i>Piper eriopodon</i>	4007	158
	<i>Piper calceolarium</i>	4048	194
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Acalypha macrostachya</i>	4050	196
	<i>Alchornea</i>	3982	140
	<i>Alchornea grandis</i>	4056	202
	<i>Acalypha diversifolia</i>	3967	126
	<i>Alchornea calophylla</i>	3969	128
	<i>Hyeronima antioquiensis</i>	3905	85
	<i>Mabea montana</i>	3912	92
	<i>Hyeronima sp</i>	3971	130

4.1.4. Obtención de los extractos

La parte aérea de las plantas en estudio se secaron en horno a 50 °C, se maceraron y se extrajeron mediante maceración pasiva con metanol, con la posterior rotaevaporación del solvente se obtuvieron los extractos a evaluar, los cuales fueron sellados y enviados al laboratorio de investigación en recursos naturales del instituto de química de la Universidad Federal de Alagoas y mantenidos en refrigeración hasta su utilización.

4.2. EVALUACIÓN DE ACTIVIDADES BIOLÓGICAS

4.2.1. Ubicación

La evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos vegetales se llevó a cabo en el Centro de Patología e Medicina Laboratorial (CPML) de la Universidade Estadual de Ciências de Saúde de Alagoas, Maceió, Alagoas.

La determinación de la actividad antioxidante se realizó en Laboratorio de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN) del Instituto de Química de la Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas.

Por último, la evaluación como larvicidas de los extractos se realizó en el laboratorio de entomología de la Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas.

4.2.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA CEPAS DE REFERENCIA Y AISLADOS CLÍNICOS

4.2.2.1. Microorganismos de ensayo

Para la evaluación de la actividad antibacteriana se usaron cepas de referencia y aislados clínicos obtenidos en el laboratorio de microbiología del Centro de Patología e Medicina Laboratorial (CPML) de la Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas (UNCISAL).

Tabla 4. Códigos de las bacterias estudiadas.

Nombre	Cepa de referencia	Cepa aislada clínicamente
<i>Gram positivas</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	IC262
<i>Gram negativas</i>		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	IC148
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC BAA 1705	---
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	---
<i>Acinetobacter baumannii</i>	---	IC89

4.2.2.2. Antibiograma

Se evaluó la resistencia de las cepas aisladas clínicamente por el método de difusión en agar siguiendo la metodología del manual de pruebas de susceptibilidad a los antimicrobianos (Cavalieri, 2005) usando discos de antibióticos marca Oxoid a una concentración de 10 µg.

4.2.2.3. Preparación del extracto

Se pesaron 10 mg de cada extracto y se disolvieron en 0,1 mL de DMSO al 100%, luego se completó con agua destilada estéril hasta 1 mL, obteniéndose una concentración del extracto igual a 10 mg/mL. De la solución anterior se tomaron 0,6 mL y se llevó a 3 mL con agua destilada estéril, obteniéndose una concentración final de extracto igual a 2 mg/mL y de DMSO 2%.

4.2.2.4. Preparación del inóculo

Se tomaron colonias aisladas de cada microorganismo con ayuda de una hisopo estéril y se diluyó en solución salina estéril hasta alcanzar turbidez equivalente a 0,5 en la escala de McFarland (1.5×10^8 UFC/mL), de esta solución se tomaron 2 mL y se diluyeron con 38 mL de solución salina estéril obteniéndose una concentración de inóculo de 5×10^5 UFC/mL (Cavalieri 2005).

4.2.2.5. Ensayo en microplacas

La metodología seguida para el bioensayo de actividad antibacteriana se basó en (Ferreira de Lima, et al., 2006) realizando algunas modificaciones. Se preparó caldo Mueller-Hinton según las recomendaciones del fabricante (Sigma-Aldrich), usando microplacas de 96 pozos se agregó a cada uno 100 µL de caldo y 100 µL de la solución de cada extracto por triplicado, obteniendo una concentración de extracto en cada pozo de 1 mg/mL, finalmente se adicionó 10 µL de inóculo ya preparado, se colocó la tapa, se agitaron las microplacas y se dejó incubar por 20 horas a 37 °C.

Se colocó como control positivo cloranfenicol 50 µg/mL y como control negativo DMSO al 1%, se colocaron además control de crecimiento (caldo Mueller-Hinton + inóculo) y control de esterilidad (caldo Mueller-Hinton).

4.2.2.6. Lectura de las microplacas

Después de la incubación se adicionaron a cada pozo 10 µL de una solución a 1 mg/mL de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) y se dejó en incubadora a 37°C por 30 minutos, la presencia de coloración violeta indicó presencia de actividad metabólica y, por tanto, que el extracto no inhibió el crecimiento del microorganismo.

El MTT es usado para visualizar la actividad de la enzima deshidrogenasa, la cual remueve el hidrógeno del sustrato y lo transfiere al aceptor de electrones, usualmente una coenzima. De la coenzima es transferido al MTT, el cual se reduce a un compuesto violeta llamado formazan. (Ramírez y Marin, 2009).

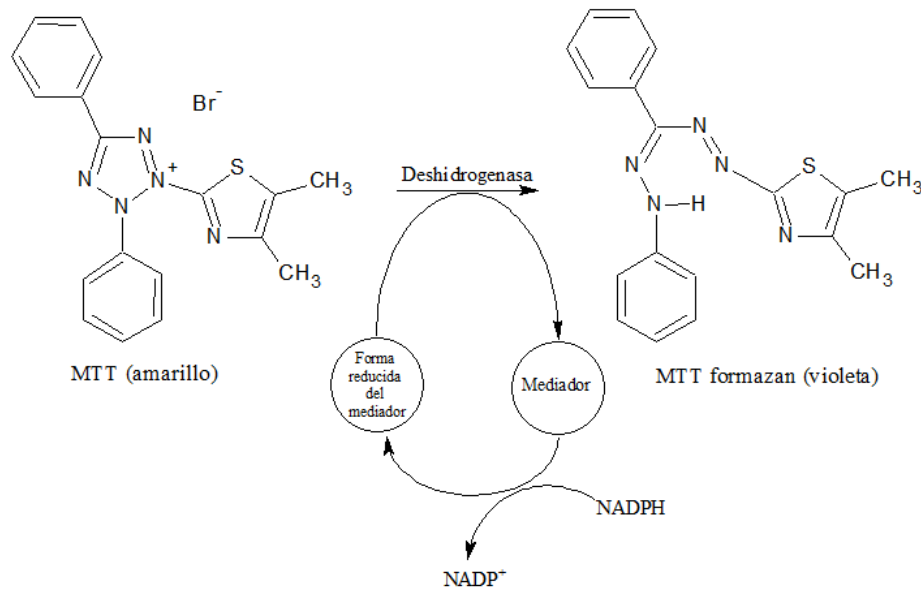


Figura 12. Reacción del MTT en presencia de actividad metabólica.

4.2.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE DPPH[•]

4.2.3.1. Preparación de las soluciones de los extractos

Se prepararon soluciones de cada extracto a una concentración igual a 1 mg/mL, pesando 10 mg de cada extracto y llevando a 1 mL con metanol (Concentración=10 mg/mL), luego, de esta solución se tomaron 0,5 mL y se llevaron a 5 mL con el mismo solvente (Concentración=1 mg/mL).

4.2.3.2. Evaluación de la actividad antioxidante

La metodología seguida para el estudio de la actividad antioxidante de los extractos vegetales estuvo basada en (Brand-Williams, et al., 1995) y (Mensor, et al., 2001) con algunas modificaciones.

En microplacas de 96 pozos se colocaron 100 µL de metanol en todos los pozos, luego se adicionó 100 µL de la solución de extracto a seis pozos de la primera fila, enseguida, con la

ayuda de una pipeta multicanal se realizaron seis diluciones sucesivas 1:2, dejando en la última fila el control (DPPH + metanol).

Se preparó una solución de DPPH 0,3 mM en metanol grado analítico en frasco color ámbar, cubriéndolo con papel aluminio inmediatamente preparada la solución, se refrigeró a 4° C entre cada ensayo, cada día de análisis se preparó una solución diferente. De la solución refrigerada se adicionaron 40 µL de la solución de DPPH a los pozos de las primeras tres columnas, dejando las siguientes tres columnas como blanco (solución de extracto + metanol), realizándose el ensayo por triplicado.

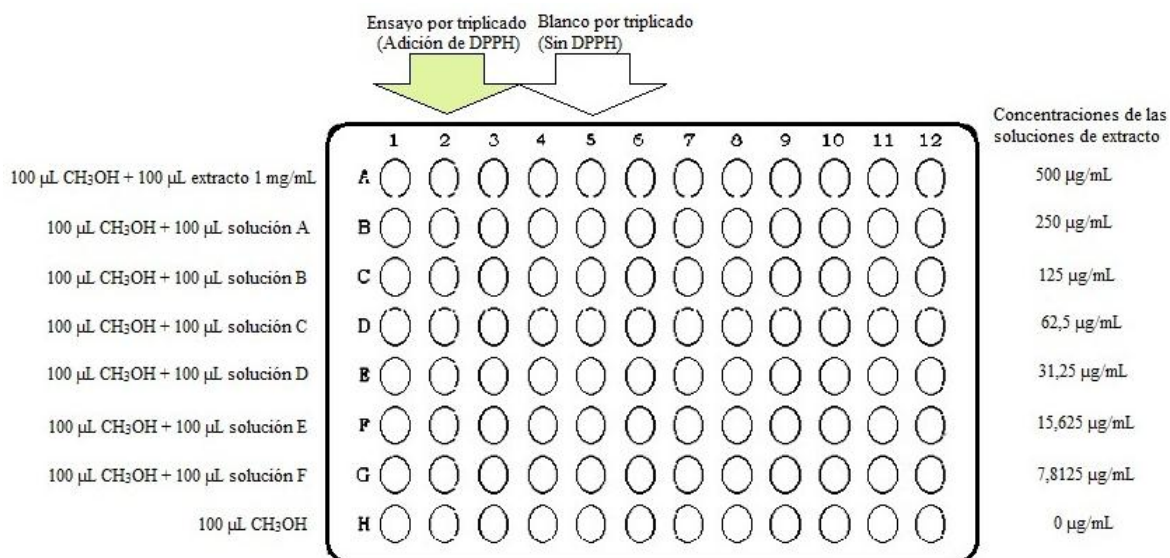


Figura 13. Diagrama de las diluciones realizadas para la medición de la absorbancia.

Después de 30 minutos de reacción, en completa oscuridad y a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a 518 nm con ayuda de un lector de microplacas Thermo Scientific Multiskan® Spectrum.

Los resultados fueron obtenidos en términos de absorbancia de la muestra, del blanco y del control a 518 nm, el porcentaje de actividad antioxidante (%AAO) para cada concentración de extracto se calcula según la siguiente expresión (Mensor, et al., 2001):

$$\%AAO = 100 - \frac{(Abs_{muestra} - Abs_{blanco}) \times 100}{Abs_{control}}$$

Donde,

Abs_{muestra}: Absorbancia de la muestra (solución de extracto + solución de DPPH)

Abs_{blanco}: Absorbancia del blanco (solución de extracto + metanol)

Abs_{control}: Absorbancia del control (solución de DPPH + metanol)

4.2.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA CONTRA *Aedes Aegypti*

4.2.4.1. Preparación de las soluciones de los extractos

Se pesaron 10 mg de cada extracto y se disolvieron en 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) al 100 %, haciendo uso de ultrasonido para completar de dilución del extracto, de la anterior solución se tomó 1 mL y se llevó a 10 mL con agua destilada alcanzando una concentración del extracto de 1000 ppm y de DMSO igual a 10 %, de esta solución se tomaron 5 mL y se llevaron a 50 mL con agua destilada, obteniéndose una concentración final del extracto de 100 ppm y de 1 % para DMSO.

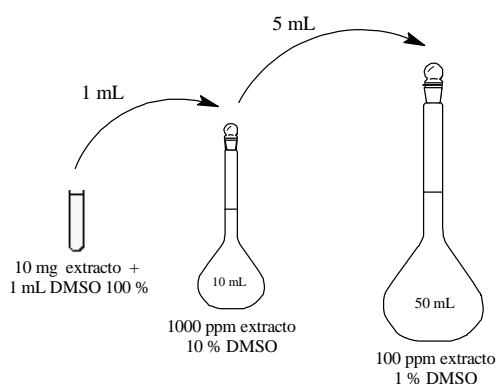


Figura 14. Diagrama de las diluciones realizadas al extracto para la evaluación como larvicida.

4.2.4.2. Evaluación de la actividad larvicida

En un vaso de plástico se colocaron 25 mL de la solución de extracto de 100 ppm y 10 larvas de *Aedes aegypti* en cuarto estadio. El ensayo se llevó a cabo por duplicado y además se realizó un control negativo con solución de DMSO al 1%. Los vasos fueron incubados a 25 – 27 °C por 48 horas, observando el número de larvas que no presentan movimiento 24 y 48 horas después de iniciado el ensayo.

El % de mortalidad larvario se obtiene según la fórmula:

$$\% M = \frac{\text{Número de larvas iniciales} - \text{Número de larvas muertas}}{\text{Número de larvas iniciales}}$$

4.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos para la actividad antibacteriana de los extractos fueron obtenidos como el promedio de un ensayo por triplicado asignando valores cuantitativos (0,1,2) a los

resultados cualitativos, es decir, cuando la coloración del MTT permaneció amarilla después de 30 minutos de incubación se asignó un valor de 2 al pozo, si la coloración del MTT era ligeramente violeta el valor del pozo era igual a 1 y si el color del MTT cambiaba completamente a violeta, demostrándose actividad metabólica, se asignó un valor de 0, después de esto, si el promedio de los valores en los tres pozos fue menor que 1, en la tabla se asigna (-) es decir que el extracto se considera inactivo, si el promedio de los tres pozos fue menor que 1,5 pero mayor que 1 se asigna (+) por lo que se considera que el extracto tiene actividad, por último, si el promedio es mayor que 1,5 en la tabla se asigna (++) lo que significa que el extracto presentó alta actividad. Para el anterior procedimiento fue utilizado el programa Microsoft® Office Excel 2010.

Los resultados de la evaluación de la actividad antioxidante fueron obtenidos de un ensayo por triplicado, calculando el porcentaje de actividad antioxidante (%AAO) para cada concentración de extracto según la siguiente expresión (Mensor, et al., 2001):

$$\%AAO = 100 - \frac{(Abs_{muestra} - Abs_{blanco}) \times 100}{Abs_{control}}$$

Después de obtenidos los porcentajes de actividad antioxidante, se ingresaron al paquete estadístico Graph-Pad Prism® versión 5.0 para Windows para realizar una regresión no lineal que permitiera calcular los valores de EC₅₀ para cada extracto.

Generalmente, es usado el modelo sigmoidal dosis-respuesta, también conocido como ecuación de Hill, para calcular el EC₅₀ de compuestos antioxidantes cuyos datos experimentales fueron obtenidos mediante el método de DPPH*, sin embargo, este modelo asume que la curva log(dosis) vs. respuesta es simétrica alrededor del punto medio (Chen, et al., 2013).

El modelo de curva dosis- respuesta está definido por cuatro parámetros: valor máximo en el estado estable, valor mínimo en el estado estable, EC₅₀ y pendiente. El programa utiliza la Ecuación de Hill o ecuación logística de cuatro parámetros definiendo la respuesta (Y) cómo función de la dosis:

$$Y = Y_{mínimo} + \frac{Y_{máximo} - Y_{mínimo}}{1 + 10^{(\log EC_{50})(Pendiente\ de\ Hill)}}$$

Van der Graaf y Schoemaker (1999) demostraron que la aplicación de la ecuación de Hill a curvas dosis-respuesta asimétricas pueden conducir a una evaluación equivocada de la potencia del antioxidante, por lo que sugieren un modelo alternativo, conocido como ecuación de Richards, el cual provee un ajuste más adecuado para los datos dosis-respuesta asimétricos, puesto que adiciona un quinto parámetro, S, el cual cuantifica la asimetría:

$$\log X_b = \log EC_{50} + \left(\frac{1}{Pendiente\ de\ Hill} \right) \times \log(2^{1/S} - 1)$$

$$Y = Y_{\text{mínimo}} + \frac{Y_{\text{máximo}} - Y_{\text{mínimo}}}{(1 + 10^{(\log X_b - X)(\text{Pendiente de Hill})})^S}$$

Mediante el paquete estadístico Graph-Pad Prism[®] se realizó una comparación de la ecuación logística de cuatro parámetros y la ecuación logística de cinco parámetros (ecuación de Richards) para cada dato con el fin de obtener el modelo al que mejor se ajustaran los datos mediante una prueba de extra suma de cuadrados F, con $P < 0,05$.

El programa define al modelo sigmoidal dosis-respuesta como la hipótesis nula y al modelo asimétrico (cinco parámetros) como la hipótesis alternativa, cuando P fuera menor que 0,05 concluye que no se rechaza la hipótesis nula y expone el modelo de preferencia.

A través del sistema SPSS 20 (Statistical Package for the Social Sciences) se realiza la prueba de normalidad a un nivel de significancia de $P < 0,05$ para los datos de porcentaje de actividad antioxidante en cada concentración de extracto y para cada familia de plantas con el fin de sugerir qué prueba estadística debería realizarse para comparar los datos.

Por último, se realiza una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis a un nivel de significancia de 0,05 con el fin de comparar estadísticamente si existe diferencia significativa entre con $P < 0,05$ entre los extractos de cada familia según el porcentaje de actividad antioxidante a la máxima concentración. Además, se realiza la misma prueba comparando los resultados de porcentaje de actividad antioxidante para cada una de las siete concentraciones de extracto evaluadas.

Los resultados de la actividad larvicida se obtienen según el promedio de la mortalidad presentada en un ensayo realizado por duplicado, el % de mortalidad se obtiene según la fórmula:

$$\% M = \frac{\text{Número de larvas iniciales} - \text{Número de larvas muertas}}{\text{Número de larvas iniciales}}$$

Los promedios se obtienen a través del programa Microsoft[®] Office Excel 2010.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

En la tabla 4 se presentan los resultados de los antibiogramas realizados para cada bacteria y el tipo de muestra de la cual fue aislada.

Tabla 4. Resultados de los antibiogramas de las bacterias aisladas clínicamente.

<i>Staphylococcus aureus</i> IC 262	
Tipo de muestra: Sangre	
Antibióticos ante los cuales presenta resistencia	
Ciprofloxacina	Oxacilina
Clindamicina	Amoxicilina-Clavulanato
Eritromicina	Cefalotina
Azitromicina	Cefalexina
Claritromicina	Gentamicina
Sulfametoxazol-Trimetroprim	
Antibióticos ante los cuales presenta sensibilidad	
Teicoplanina	
<i>Pseudomona aeruginosa</i> IC148	
Tipo de muestra: Herida	
Antibióticos ante los cuales presenta resistencia	
Imipenem	Ceftazidima
Meropenem	Aztreonam
Ciprofloxacina	Amicacina
Levofloxacina	Gentamicina
Cefepime	
Antibióticos ante los cuales presenta sensibilidad	
Polimixina B	
<i>Acinetobacter baumannii</i> IC89	
Tipo de muestra: Secreción traqueal	
Antibióticos ante los cuales presenta resistencia	
Cefepime	Amicacina
Ceftazidima	Gentamicina
Ceftriaxona	Ampicilina-Sulbactam
Aztreonam	Meropenem
Ciprofloxacina	Imipenem
Levofloxacina	
Antibióticos ante los cuales presenta sensibilidad	
Tetraciclina	Polimixina B

La información acerca de la estructura química, la familia y tipo de antibiótico y el lugar y mecanismo de acción de cada uno de los antibióticos incluidos en el antibiograma de cada bacteria aislada clínicamente se presenta en el anexo I.

Los resultados obtenidos para la actividad antibacteriana de los extractos se presentan en la tabla 5, además, se muestran en el anexo 1 las fotos de las microplacas tal y como se obtuvieron después de adicionar el reactivo indicador (MTT) e incubar por 30 minutos.

Tabla 5. Resultados de la evaluación como antibacterianos de los extractos metanólicos de cada especie vegetal.

Cod UTP	Familia	Especie	<i>S.a.</i> ATCC 25923	<i>P.a.</i> ATCC 27853	<i>K.p.</i> ATCC BAA 1705	<i>E.c.</i> ATCC 25922	<i>P.a.</i> IC148	<i>A.b.</i> IC89	<i>S.a.</i> IC262
120	<i>Solanaceae</i>	<i>Solanum acerifolium</i>	-	-	-	-	-	-	-
121		<i>Solanum cf umbellatum</i>	-	-	-	-	-	-	-
145		<i>Dunalia solanacea</i>	-	-	-	-	-	-	-
173		<i>Solanum ovalifolium</i>	-	-	-	-	+	-	+
137		<i>Cestrum sp</i>	-	-	-	-	-	-	-
171		<i>Browallia speciosa</i>	-	-	-	-	-	-	-
170		<i>Deprea aff sachapapa</i>	-	-	-	-	-	-	-
174		<i>Solanum brevifolium</i>	-	-	-	-	-	-	-
129		<i>Solanum sp</i>	-	-	-	-	-	-	-
165		<i>Witheringia coccoloboides</i>	-	-	-	-	-	-	-
188		<i>Solanum trachycyphum</i>	+	-	-	-	-	-	+
161		<i>Solanum sp</i>	++	-	+	++	-	++	++
164		<i>Solandra coriacea</i>	-	-	-	-	-	-	-
168		<i>Cestrum humboldtii</i>	-	-	-	-	-	-	-
134		<i>Solanum lepidotum</i>	-	-	-	-	-	-	-
146		<i>Lycianthes radiata</i>	-	-	-	-	-	-	-
189		<i>Solanum sp</i>	-	-	-	-	-	-	-
148	<i>Piperaceae</i>	<i>Piper pesaresanum</i>	++	-	-	++	-	++	++
197		<i>Piper daniel-gonzalezii</i>	-	-	-	-	-	-	-
172		<i>Piper glanduligerum</i>	-	-	-	-	-	-	+
167		<i>Piper crassinervium</i>	+	-	+	-	+	+	++
163		<i>Piper umbellatum</i>	-	-	-	-	-	-	+
175		<i>Piper crassinervium</i>	+	-	-	-	+	-	++

154		<i>Peperomia acuminata</i>	+	-	-	-	-	-	-
158		<i>Piper eriopodon</i>	+	-	-	-	-	-	-
194		<i>Piper calceolarium</i>	+	-	-	-	+	-	++
196	<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Acalypha macrostachya</i>	-	-	-	-	-	-	-
140		<i>Alchornea</i>	-	-	-	-	-	-	++
202		<i>Alchornea grandis</i>	+	-	-	-	-	-	++
126		<i>Acalypha diversifolia</i>	+	-	-	-	-	+	++
128		<i>Alchornea calophylla</i>	+	-	-	-	-	-	++
85		<i>Hyeronima antioquiensis</i>	-	-	-	-	-	-	+
92		<i>Mabea montana</i>	-	-	-	-	-	-	+
130		<i>Hyeronima sp</i>	-	-	-	-	-	-	+

(S.a.: *Staphylococcus aureus*, P.a.: *Pseudomonas aeruginosa*, K.p.: *Klebsiella pneumoniae*, E.c.: *Escherichia coli*, A.b.: *Acinetobacter baumannii*) (-: El extracto se considera inactivo, +: El extracto posee actividad, ++: El extracto posee alta actividad)

La evaluación de la actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* IC 148, *Acinetobacter baumannii* IC 89 y *Staphylococcus aureus* IC 262 realizada a 1 mg/mL arrojó importantes resultados, obteniéndose que de los 34 extractos estudiados 18 (53%) presentan actividad media o alta contra al menos una de las bacterias, tal como se muestra en la figura 15.

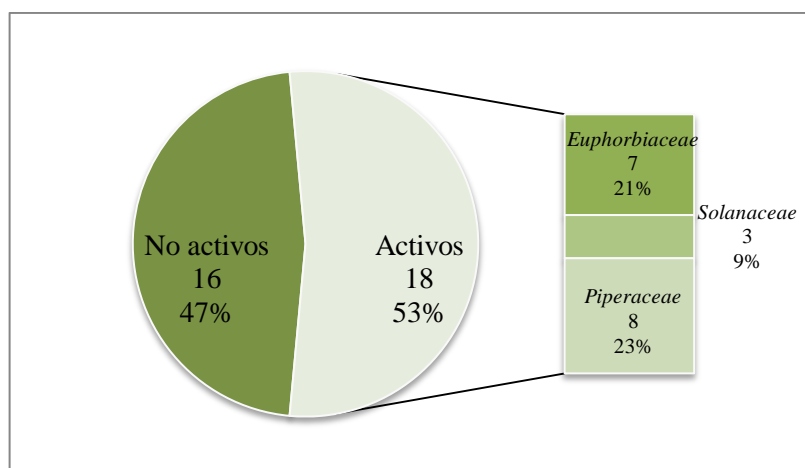


Figura 15. Diagrama de la cantidad de extractos que fueron activos contra al menos una de las bacterias estudiadas.

Para la familia *Solanaceae*, se evaluaron 17 extractos, de los cuales 3 fueron activos contra al menos una de las bacterias estudiadas, mientras que para la familia *Piperaceae* de 9 extractos evaluados 8 presentaron actividad antibacteriana, por último, la familia *Euphorbiaceae* de 8 extractos estudiados 7 extractos fueron activos contra al menos una bacteria.

Teniendo en cuenta los extractos que fueron activos contra cada bacteria, se observa que para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, 3 extractos de la familia *Euphorbiaceae*, 6 de la familia *Piperaceae* y 2 de la familia *Solanaceae* fueron activos.

Respecto a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ninguno de los extractos estudiados presentó actividad, lo que probablemente se deba al hecho de que por tratarse de una bacteria gramnegativa los componentes de la pared celular la hacen menos sensible a la entrada de compuestos antibióticos al interior de la célula.

En lo que respecta a *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA1705 un extracto de la familia *Piperaceae* y uno de la familia *Solanaceae* mostraron actividad, este es un resultado interesante dado que esta cepa presenta un mecanismo de resistencia a los antibióticos debido a la capacidad que tiene de producir carbapenemasas, enzimas capaces de hidrolizar los antimicrobianos de la familia de los carbapenemes, aunque también presenta resistencia a otros antibióticos comerciales de las familias de las penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, entre otras.

Frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 un extracto de la familia *Piperaceae* y uno de la familia *Solanaceae* fueron activos.

Para los aislados clínicos, que según los antibiogramas son cepas bacterianas con una resistencia comprobada a varios antibióticos comerciales se obtuvo que frente a *Pseudomonas aeruginosa* IC148 tres extractos de la familia *Piperaceae* y uno de la familia *Solanaceae* fueron activos.

Para *Acinetobacter baumannii* IC89 un extracto de la familia *Euphorbiaceae*, dos de la familia *Piperaceae* y uno de la familia *Solanaceae* mostraron actividad.

Por último, en relación con *Staphylococcus aureus* IC262 siete extractos de la familia *Euphorbiaceae* reportaron actividad, seis extractos de la familia *Piperaceae* también lo hicieron y tres extractos de la familia *Solanaceae* fueron activos contra este aislado clínico.

En la figura 15 se observa que tanto la familia *Piperaceae* como la familia *Solanaceae* tienen especies activas contra seis de las siete bacterias estudiadas, teniendo en cuenta que para la familia *Piperaceae* el número de extractos activos fue igual o mayor al número de extractos activos de la familia *Solanaceae*. La familia *Euphorbiaceae*, por su lado, mostró una cantidad importante de extractos activos contra el aislado clínico de *Staphylococcus aureus*, pero solo tiene extractos activos contra otras dos bacterias (*S. aureus* ATCC25923 y *A. baumannii* IC89)

Según la figura 16 solo un extracto de la familia *Solanaceae* (*Solanum sp.*) y uno de la familia *Piperaceae* (*Piper pesaresanum*) fueron muy activos contra *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, *A. baumannii* IC89 y *S. aureus* IC262; además, tres extractos más de la familia *Piperaceae* (*Piper crassinervium*, *Piper calceolarium*) y cuatro extractos de la familia *Euphorbiaceae* (*Alchornea*, *Alchornea grandis*, *Acalypha diversifolia* y *Alchornea calophylla*) fueron muy activos contra el aislado clínico de *Staphylococcus aureus*.

De acuerdo con (Fabry, et al., 1998) para que extractos crudos de plantas sean considerados como potencialmente útiles en terapéutica, el valor de la concentración mínima inhibitoria debe ser menor a 8 mg/mL, por su parte (Ríos y Recio, 2005) sugieren que para extractos vegetales se evite evaluar la actividad antimicrobiana a una concentración superior a 1 mg/mL.

La concentración a la que fueron evaluados los extractos metanólicos de *Solanum sp.* y *Piper pesaresanum*, los cuales fueron altamente activos frente a las cepas de referencia de *S. aureus* y *E. coli* y frente a los aislados clínicos de *A. baumannii* y *S. aureus*, fue igual a 1 mg/mL, lo cual podría calificar estos extractos como promisorios por su actividad farmacológica, cabe tener en cuenta que no se realizó dilución alguna a los extractos, por lo que la concentración mínima inhibitoria puede ser menor a 1 mg/mL.

Los extractos de *Alchornea*, *Alchornea grandis*, *Alchornea diversifolia*, *Alchornea calophylla*, *Piper crassinervium* y *Piper calceolarium*, también fueron altamente activos frente al aislado clínico de *S. aureus* a una concentración igual a 1 mg/mL, de igual manera, se sugiere que la concentración mínima inhibitoria es menor que esta concentración.

Los extractos de las especies *Solanum trachycyphum*, *Piper crassinervium*, *Piper umbellatum*, *Piper crassinervium*, *Peperomia acuminata*, *Piper eriopodon*, *Piper calceolarium*, *Acalypha macrostachya*, *Alchornea*, *Alchornea grandis*, *Acalypha diversifolia*, *Alchornea calophylla* presentaron mediana actividad contra *S. aureus* ATCC 25923 y los extractos de *Solanum ovalifolium*, *Witheringia coccoloboides*, *Piper glanduligerum*, *Piper umbellatum*, *Hyeronima antioquiensis*, *Mabea montana*, *Hyeronima sp.* contra *S. aureus* IC262 a una concentración de 1 mg/mL, es decir, que para el extracto la CMI podría ser menor, considerándose entonces que estas especies poseen un importante potencial en farmacéutica contra una de las bacterias grampositivas que se presenta con mayor frecuencia en clínica y que desde que se descubrió su tratamiento ha evolucionado rápidamente en el desarrollo de mecanismos de resistencia.

Frente a bacterias gramnegativas, los extractos de las especies vegetales *Solanum sp.* y *Piper crassinervium* fueron medianamente activos contra *K. pneumoniae* ATCC BAA1705 a una concentración de 1 mg/mL, a pesar de que esta bacteria es productora de carbapenemasas, lo que la hace resistente a una cantidad significativa de antibióticos de la familia de los β -lactámicos.

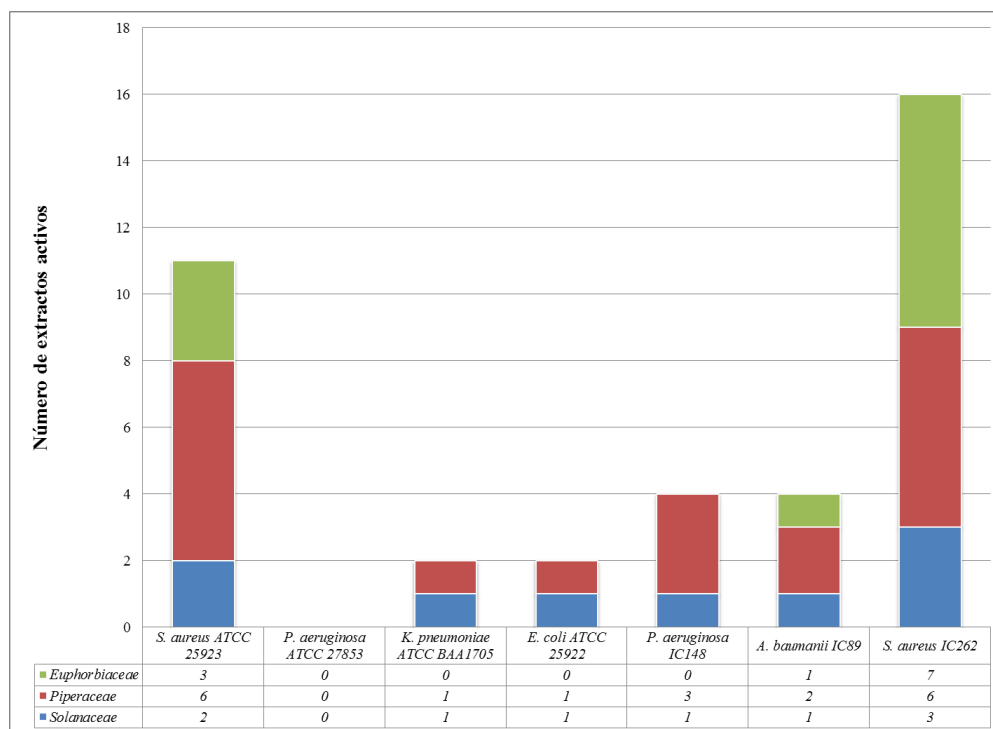


Figura 16. Gráfico de barras del número de extractos que presentaron actividad contra cada una de las bacterias estudiadas.

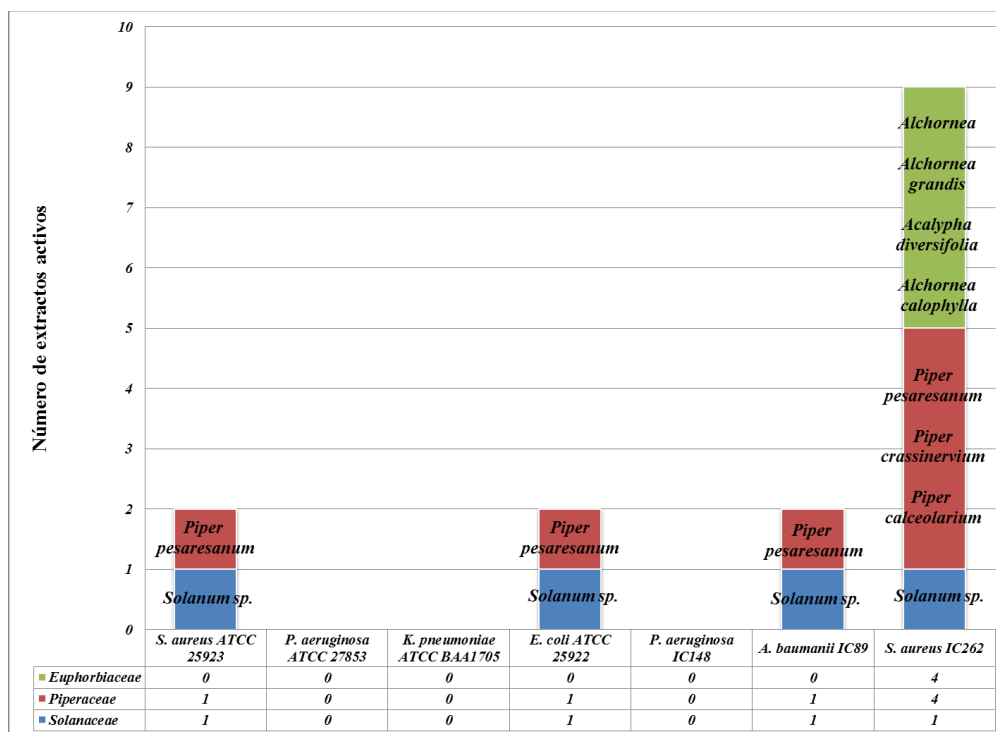


Figura 17. Gráfico de barras del número de extractos que presentaron actividad alta contra cada una de las bacterias estudiadas.

Respecto a los aislados clínicos de bacterias gramnegativas los extractos de *Solanum ovalifolium*, *Piper crassinervium*, *Piper crassinervium* y *Piper calceolarium* inhibieron el crecimiento de *P. aeruginosa* IC48 a esta misma concentración, cabe anotar que esta cepa bacteriana mostró resistencia a los β -lactámicos, las quinolonas y los aminoglucósidos.

Frente a *A. baumannii* IC89 los extractos que presentaron mediana actividad a 1 mg/mL fueron *Piper crassinervium* y *Acalypha diversifolia*, teniendo en cuenta que esta bacteria también presentó resistencia a β -lactámicos, quinolonas y aminoglucósidos.

Otros estudios realizados en el grupo de investigación en biotecnología y productos naturales de la Universidad Tecnológica de Pereira (GBPN) han demostrado que la especie *Solanum sp.* que presentó alta actividad contra cuatro de las siete bacterias de prueba contiene una alta concentración de alcaloides, a los cuales podría atribuírsele dicha actividad. Por su parte, el extracto de *Piper pesaresanum*, también altamente activo, posee un gran contenido de alcaloides, como también fenoles, taninos y flavonoides en menor cantidad.

Otras especies de las familias *Solanaceae*, *Piperaceae* y *Euphorbiaceae* halladas en nuestro país han presentado actividad antibacteriana, es el caso del extracto metanólico de *Piper lancifolium* activo a 100 mg/mL contra *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina, el extracto de *Solanum sp.* también fue activo a esta concentración frente a *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina, ambas especies vegetales recolectadas en la zona del valle de Sibundoy en el departamento del Putumayo (Lopez, et al., 2001).

Por su parte, los extractos etanólicos de diferentes especies de la familia *Piperaceae* recolectadas en el departamento del Chocó han exhibido actividad antibacteriana, por ejemplo, las especies vegetales *Piper tricuspe* y *Piper sanctifelicis* mostraron actividad frente a *S. aureus* ATCC 25923 a una concentración de 10 mg/mL mientras que *Piper aff arboreum* y *Piper gorgonillense* inhibieron el crecimiento de esta bacteria a una concentración de 20 mg/mL, por su parte las especies *Piper multipinervium* y *Piper peltatum* solo lograron ser activas a una concentración de 40 mg/mL contra esta misma bacteria. Frente a *E. coli* ATCC 25922 a una concentración de 40 mg/mL fueron activos los extractos de *Piper aff arboreum* y *Piper gorgonillense*, mientras que el extracto de *Piper tricuspe* fue activo a 20 mg/mL. Sin embargo, ninguno de los extractos etanólicos de las especies de la familia *Piperaceae* provenientes del Chocó reportaron actividad contra *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. (Pino y Stashenko, 2009)

En el continente americano otras especies de las familias *Solanaceae*, *Piperaceae* y *Euphorbiaceae* han mostrado actividad antibacteriana, es el caso del extracto etanólico de *Acalypha monostachya* Cav. de la familia *Euphorbiaceae* proveniente de México, el cual inhibió el desarrollo de *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 25619 y *E. coli* ATCC 25922 (Macías S., et al., 2009). Proveniente de la península de Yucatán en este mismo país, el extracto metanólico de *Solanum hirtum* mostró actividad frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. (Sánchez-Medina, et al., 2001). En este mismo país,

los extractos de las especies *Piper amalago* y *Piper auritum* de la familia *Piperaceae* y *Croton draco* de la familia *Euphorbiaceae* exhibieron actividad antibacteriana frente a *E. coli* y *S. aureus*. (Yasunaka, et al., 2005)

Provenientes de la ciudad de Pucallpa en el centro-oriente de Perú, el extracto etanólico de *Brunfelsia grandiflora* D. Don de la familia *Solanaceae* fue activa contra *S. aureus* (CMI=4 mg/mL) y *P. aeruginosa* (CMI=16 mg/mL), de la familia *Piperaceae* el extracto de *Piper aduncum* L. presentó una CMI=1 mg/mL para *S. aureus* y *Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn. de la familia *Euphorbiaceae* fue activa frente a *S. aureus* (CMI=4 mg/mL), *E. coli* (CMI=16 mg/mL) y *P. aeruginosa* (CMI=8 mg/mL), las tres cepas bacterianas fueron las mismas cepas ATCC estudiadas en el presente trabajo (Kloucek, et al., 2005). De este mismo país, el extracto etanólico de *Cestrum sp.*, una de las especies de la familia *Solanaceae* estudiadas en este trabajo, no mostró actividad contra *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922, lo que está en acuerdo con los resultados obtenidos. Por su parte, los extractos de *Croton lechleri* Müll. Arg. y *Hura crepitans* L. de la familia *Euphorbiaceae* fueron activos frente a *S. aureus* (CMI=2 mg/mL y 1 mg/mL) siendo *Croton lechleri* Müll. Arg. también activo contra *Escherichia coli* (CMI=4 mg/mL), *Piper aduncum* L. fue activa solamente frente a *S. aureus* (CMI=16 mg/mL) y *Solanum americanum* Mill. frente a *E. coli* (CMI=128 mg/mL). (Bussmann, et al., 2010)

En Ghana, el extracto etanólico de la especie *Alchornea cordifolia* de la familia *Euphorbiaceae* presentó actividad antibacteriana frente a *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853, así como también frente a dos cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (Pesewu, et al., 2008). El estudio de plantas medicinales en Yemen, arrojó que el extracto metanólico de la especie *Solanum nigrum* (*Solanaceae*) posee actividad antibacteriana contra *E. coli* ATCC 25922 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 (CMI=0,5 mg/mL para ambas bacterias) actividad que según los autores probablemente se debe a la presencia de alcaloides (Al-Fatimi, et al., 2007).

5.2. RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

En la tabla 6 se presentan los resultados del estudio de la actividad antioxidante como porcentaje de actividad antioxidante (%AAO) para una concentración de extracto igual a 500 µg/mL y el EC₅₀ para cada extracto (cantidad de antioxidante necesaria para disminuir en 50% la absorbancia inicial de DPPH[•]) obtenido mediante una regresión no lineal según el procedimiento descrito en 4.3.

Tabla 6. Porcentaje de actividad antioxidante a 500 µg/mL y 125 µg/mL y EC₅₀ para los extractos metanólicos de las especies vegetales evaluadas.

Código UTP	Familia	Especie	%AAO a 500 µg/mL	%AAO a 125 µg/mL	EC ₅₀ (µg/mL)	
120	Solanaceae	<i>Solanum acerifolium</i>	74,72	48,29	106,8	
121		<i>Solanum cf umbellatum</i>	92,50	55,02	143,4	
145		<i>Dunalia solanacea</i>	48,33	18,54	283,2	
173		<i>Solanum ovalifolium</i>	95,09	57,24	105,7	
137		<i>Cestrum sp</i>	70,07	58,77	92,59	
171		<i>Browallia speciosa</i>	64,34	24,58	699,2	
170		<i>Deprea aff sachapapa</i>	0,00	0,00	231,3	
174		<i>Solanum brevifolium</i>	46,27	0,00	1522	
129		<i>Solanum sp</i>	87,61	50,89	137,9	
165		<i>Witheringia coccoloboides</i>	84,75	3,24	343,2	
188		<i>Solanum trachycyphum</i>	20,25	0,00	396,2	
161		<i>Solanum sp</i>	87,15	24,75	267,7	
164		<i>Solandra coriacea</i>	71,28	39,81	277,1	
168		<i>Cestrum humbolditii</i>	15,12	0,00	NC	
134		<i>Solanum lepidotum</i>	76,69	37,66	330,4	
146		<i>Lycianthes radiata</i>	100,0	14,40	1403	
189		<i>Solanum sp</i>	90,93	11,85	468,5	
148		Piperaceae	<i>Piper pesaresanum</i>	100,0	35,33	NC
197			<i>Piper daniel-gonzalezii</i>	100,0	97,22	49,48
172	<i>Piper glanduligerum</i>		81,54	55,52	191,4	
167	<i>Piper crassinervium</i>		90,76	85,56	61,62	
163	<i>Piper umbellatum</i>		59,64	27,47	NC	
175	<i>Piper crassinervium</i>		84,39	72,08	72,59	
154	<i>Peperomia acuminata</i>		93,75	75,04	NC	
158	<i>Piper eriopodon</i>		92,70	79,59	43,29	
194	<i>Piper calceolarium</i>		79,92	55,26	141,3	
196	Euphorbiaceae	<i>Acalypha macrostachya</i>	82,43	51,12	104,3	
140		<i>Alchornea</i>	87,10	96,47	30,67	
202		<i>Alchornea grandis</i>	87,82	99,42	13,01	
126		<i>Acalypha diversifolia</i>	97,63	100	NC	
128		<i>Alchornea calophylla</i>	94,35	98,25	NC	
85		<i>Hyeronima antioquiensis</i>	92,25	100	0,686	
92		<i>Mabea montana</i>	95,25	96,31	12,35	
130		<i>Hyeronima sp</i>	96,59	75,68	66,59	
Hidroquinona (1000 µg/mL)			50,08		--	

En general, los extractos metanólicos de las especies vegetales evaluadas mostraron un alto porcentaje de actividad antioxidante, las especies *Lycianthes radiata*, *Piper pesaresanum* y *Piper daniel-gonzalezii* presentaron un %AAO igual a 100% a una concentración de 500 µg/mL y, las especies *Acalypha diversifolia* y *Hyeronima antioquiensis* a 125 µg/mL también mostraron un porcentaje de actividad antioxidante igual a 100%. Otros estudios realizados por el grupo de investigación biotecnología y productos naturales, presentes en el anexo 4, han demostrado que estas especies poseen un alto contenido de flavonoides y fenoles, compuestos con los cuales se puede relacionar el alto porcentaje de actividad antioxidante obtenido para cada una.

Respecto a las especies de la familia *Solanaceae* de 17 extractos evaluados, 12 de ellos poseen %AAO a 500 µg/mL mayor a 50 % (71 % de los extractos evaluados), mientras que todas las especies de la familia *Piperaceae* y *Euphorbiaceae* presentaron un porcentaje de actividad antioxidante superior a 50 % a esta misma concentración.

A una concentración de extracto igual a 125 µg/mL, para 4 extractos de la familia *Solanaceae* (24%), 7 de la familia *Piperaceae* (78%) y 8 de la familia *Euphorbiaceae* (100%) se obtuvo un porcentaje de actividad antioxidante superior a 50%.

Frente a los valores obtenidos para EC₅₀ debe tenerse en cuenta que cuanto menor es este parámetro el potencial antioxidante del extracto es mayor. Para la especie *Hyeronima antioquiensis* el EC₅₀ calculado fue igual a 0,686 mg/L; otros valores bajos de EC₅₀ los presentaron las especies *Mabea montana* y *Alchornea grandis* con 12,35 mg/L y 13,01 mg/L, respectivamente, las tres especies pertenecientes a la familia *Euphorbiaceae*. La marcha fitoquímica de los extractos metanólicos de estas tres especies (Anexo 4) demuestra que se encuentran presentes compuestos fenólicos, flavonoides y taninos, compuestos que, en la literatura, se ha mostrado que poseen propiedades antioxidantes (Poullain, et al., 2004).

Los resultados obtenidos para la familia *Piperaceae* se encuentran en consonancia con resultados publicados para otras especies de la misma familia, es el caso de los extractos metanólicos de *Piper putumayoense* y *Piper krukoffii* de la región amazónica, las cuales presentaron alta actividad antioxidante evidenciada a través del ensayo TEAC (Lizcano, et al., 2010).

Por su parte, para la especie *Piper fulvescens* en Paraguay, se obtuvo una concentración inhibitoria 50% (IC₅₀) de 76,7 µg/mL, similar a la obtenida en este estudio para la especie *Piper crassinervium* (72,59 µg/mL), sin embargo, los autores sugieren para el extracto de *Piper fulvescens* el mecanismo antioxidante se da por rompimiento del anillo (Velázquez, et al., 2003).

Como lo demuestra (Mosquera M., et al., 2007) las especies de la familia *Euphorbiaceae* y, en particular, del género *Acalypha* presentan un alto potencial antioxidante, con porcentajes de actividad antioxidante superiores a 50% a 250 mg/L evaluados mediante el método de DPPH.

El extracto metanólico de la especie *Acalypha fruticosa* en India, demostró poseer importante actividad antioxidante, comparable con la actividad presentada por el compuesto butil hidrotolueno (BHT) utilizado como control, los autores atribuyen dicha actividad al alto contenido de flavonoides del extracto (Thambiraj J, et al., 2012).

En el presente estudio las especies del género *Alchornea* también muestran importante actividad antioxidante, es el caso de *Alchornea* sp. con EC_{50} de 30,67 $\mu\text{g/mL}$, *Alchornea grandis* con EC_{50} igual a 13,01 $\mu\text{g/mL}$ y *Alchornea calophylla* que mostró porcentajes de actividad antioxidante superiores a 90%; en consonancia con lo anterior, en el oeste de África el extracto acuoso de la especie *Alchornea cordifolia* demostró poseer significativa actividad antioxidante con un IC_{50} de 6,5 mg/L , además de poseer un alto contenido de flavonoides (Kouakou-Siransy, et al., 2010).

Especies de la familia *Solanaceae* también han demostrado tener actividad captadora de radicales libres evaluada a través del radical DPPH, tal es el caso del extracto metanólico de *Solanum nigrum* en Yemen, que presentó un %AAO igual a 94,5% a 500 $\mu\text{g/ml}$ (Al-Fatimi, et al., 2007).

Los extractos metanólicos de especies del género *Peperomia* (*Peperomia elliptica*) y *Acalypha* (*Acalypha integrifolia*) en la isla Reunión presentaron, a través del ensayo con DPPH, actividad antioxidante leve y moderada, respectivamente (Poullain, et al., 2004).

Para los grupos definidos por las siete concentraciones evaluadas el contraste de normalidad según la prueba de Shapiro-Wilk demuestra que para las concentraciones 250 ppm y 500 ppm no se cumple el supuesto de normalidad ($P < 0,05$) y, por tal, se concluye que la distribución de los datos no es normal, por lo tanto, se realiza un ANOVA no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis), a través de la cual se obtiene que existe diferencia significativa entre los grupos con una significancia menor a 0,05, encontrándose diferencias significativas entre los grupos de concentraciones 7,8125 y 125 ppm, 7,8125 y 250 ppm, 7,8125 y 500 ppm, 15,625 y 250 ppm, 15,625 y 500 ppm, 31,25 y 250 ppm, 31,25 y 500 ppm y 62,5 y 500 ppm, es decir que, estadísticamente el efecto antioxidante de los extractos vegetales es diferente entre las concentraciones menores a 62,5 ppm y las concentraciones mayores a 250 ppm. Los resultados descritos se presentan en el anexo 3, se resaltan los niveles de significancia menores a 0,05 en amarillo, para demostrar entre cuales grupos existe diferencia significativa.

Por otro lado, al comparar el porcentaje de actividad antioxidante a una concentración de extracto igual a 500 ppm para las tres familias botánicas a las cuales pertenecen los extractos, el contraste de normalidad arroja que la distribución de los resultados para las solanáceas no es normal ($P = 0,027 < 0,05$), por lo que nuevamente se realiza la prueba de Kruskal-Wallis a la totalidad de los datos, obteniéndose que existen diferencias significativas respecto al porcentaje de actividad antioxidante entre las familias *Solanaceae* y *Euphorbiaceae*, pero estadísticamente la diferencia entre las familias *Solanaceae* y

Piperaceae, como entre las familias *Euphorbiaceae* y *Piperaceae* no es significativa, los resultados obtenidos se presentan en el anexo 4.

5.3. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD LARVICIDA

En la tabla 7 se presentan los resultados obtenidos durante la evaluación como larvicidas contra *Aedes aegypti* en cuarto estadio de algunos extractos de la familia *Piperaceae*, puesto que el ensayo se llevó a cabo por duplicado el número de larvas muertas se obtiene como un promedio.

Tabla 7. Resultados de la actividad larvicida de las especies vegetales de la familia *Piperaceae*.

Familia	Especie	No. de larvas iniciales	24 horas		48 horas	
			No. de larvas muertas	% Mortalidad	No. de larvas muertas	% Mortalidad
<i>Piperaceae</i>	<i>Piper pesaeresanum</i>	10	5	50	7	70
	<i>Peperomia acuminata</i>	10	0	0	0	0
	<i>Piper eriopodon</i>	10	0	0	0	0
	<i>Piper umbellatum</i>	10	0	0	0	0
	<i>Piper crassinervium</i>	10	0	0	0	0
	<i>Piper glanduligerum</i>	10	0	0	0	0
	<i>Piper calceolarium</i>	10	0	0	0	0
DMSO 1%		10	0	0	0	0
Temephos (3 µg/mL)		10	10	100	-	-

La resultados presentados en la tabla 7 dejan ver que el extracto metanólico de *Piper pesaeresanum* mostró actividad contra las larvas de *Aedes aegypti* en su cuarto estado larval con un porcentaje de mortalidad igual a 70% después de 48 horas. Estudios realizados en el grupo de investigación biotecnología y productos naturales (GBPN) demuestran que el extracto metanólico de esta especie presenta un alto contenido de alcaloides, superior al de las demás especies de la familia *Piperaceae* (Anexo 4), por lo que cabría atribuir la bioactividad obtenida a este tipo de compuestos.

El extracto etanólico de las hojas de *Piper arboreum* en Brasil, presentó 15% de mortalidad en larvas de *Aedes aegypti* en cuarto estadio a una concentración de 500 ppm de extracto (de S. Luna, et al., 2005). En Korea, con el extracto metanólico de la fruta de *Piper nigrum*, a una concentración de 5 ppm, se obtuvo 100% de mortalidad para el cuarto estadio larval de las especies *Aedes aegypti*, *Aedes togoi* y *Culex pipiens pallens* (Yang, et al., 2004).

Extractos metanólicos de las especies *Piper aduncum* y *Piper patulum* en Guatemala mostraron actividad larvicida contra el primer estadio de *Anopheles albimanus*, sin embargo, los extractos de otras especies como *P. auritum*, *P. jacquemontianum*, *P. oradendron*, *P. retalhuleuense*, *P. scabrum*, *P. schippianum*, *P. umbellatum* no presentaron actividad contra alguno de los cuatro estadios larvarios de las especies *Anopheles albimanus* y *Stegomyia aegypti* (Rojas Barrios, et al., 2010).

6. CONCLUSIONES

La actividad antibacteriana contra cepas de referencia y bacterias multirresistentes de 34 extractos metanólicos de especies vegetales de las familias *Solanaceae*, *Piperaceae* y *Euphorbiaceae* fue evaluada a una concentración igual a 1 mg/mL, obteniéndose que las especies *Solanum sp.* y *Piper pesaresanum* poseen alta actividad contra *Staphylococcus aureus* ATCC25923 y un aislado clínico multirresistente de esta bacteria, *Escherichia coli* ATCC25922 y un aislado clínico multirresistente de *Acinetobacter baumannii*.

La actividad antioxidante a través del método DPPH también fue estudiada para los 34 extractos metanólicos, a través de lo cual se concluye que todas las especies de las familias *Piperaceae* y *Euphorbiaceae* y el 71 % de las especies de la familia *Solanaceae* presentan un alto potencial antioxidante, obteniéndose a una concentración igual a 500 mg/L porcentajes de actividad antioxidante superiores al 50 %. En particular, para la especie *Hyeronimia antioquiensis* (*Euphorbiaceae*) se obtuvo un EC₅₀ igual a 0,69 mg/L.

Siete extractos de la familia *Piperaceae* fueron evaluados como larvicidas, solamente el extracto de *Piper pesaresanum* presentó actividad larvicida a 100 ppm contra *Aedes aegypti* en su cuarto estado larval, con un porcentaje de mortalidad de 50 % a 24 horas y 70 % a 48 horas.

En la búsqueda de compuestos antimicrobianos, se podrían considerar con un importante potencial las especies *Solanum sp.* y *Piper pesaresanum* dada su alta actividad contra cuatro de las bacterias en estudio, como también las especies *Alchornea*, *Alchornea grandis*, *Acalypha diversifolia*, *Alchornea calophylla* (*Euphorbiaceae*) por su actividad contra el aislado clínico multirresistente de *S. aureus*. Por su parte para la búsqueda de compuestos antioxidantes las especies de las familias *Euphorbiaceae* y *Piperaceae* podrían considerarse de gran interés, sin dejar de lado las especies *Lycianthes radiata*, *Solanum sp.*, *Solanum cf umbellatum* y *Solanum ovalifolium* de la familia *Solanaceae* que para una concentración igual a 500 µg/mL se obtuvieron porcentajes de actividad antioxidante superiores a 90%. La especie *Piper pesaresanum*, posee potencial como agente larvicida contra el cuarto estadio larval de *Aedes aegypti*.

7. PERSPECTIVAS

Se recomienda realizar diluciones sucesivas a los extractos de *Piper pesaesanum* y *Solanum sp.* con el fin de obtener la concentración mínima inhibitoria de los extractos contra *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Staphylococcus aureus* IC262 *Escherichia coli* ATCC25922 y *Acinetobacter baumannii* IC89. También podría considerarse la determinación de la concentración mínima inhibitoria de los demás extractos vegetales que demostraron actividad media y alta contra las diferentes cepas bacterianas de importancia clínica.

Futuros estudios son requeridos para aislar e identificar los metabolitos secundarios responsables de las actividades biológicas demostradas.

Se sugiere realizar ensayos de las actividades biológicas incluidas en este trabajo, entre otras, para una mayor cantidad de especies vegetales de la ecorregión cafetera colombiana con el fin de realizar más estudios de bioprospección de la flora colombiana, resaltando su importancia farmacológica.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abarca V, K., Dabanch P., J., González C., C., Maggi C., L., Olivares C., R., Perret P., C., Rodríguez T., J. y Vergara F., R. (2001). "Fiebre amarilla." Revista Chilena de Infectología **18**(1): 64-68.
- Al-Fatimi, M., Wurster, M., Schröder, G. y Lindequist, U. (2007). "Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen." Journal of Ethnopharmacology **111**(3): 657-666.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S. y Robards, K. (2002). "Methods for testing antioxidant activity." The Analyst **127**(1): 183-198.
- Ausina Ruiz, V., Moreno Guillén, S. y [coordinadores] (2006). Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Buenos Aires, Madrid, Editorial Médica Panamericana, S.A.
- Ausina Ruiz, V. y Prats Pastor, G. (2006). Principales grupos de seres vivos con capacidad patógena para el hombre. Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciones y Microbiología. Buenos Aires; Madrid, Editorial Médica Panamericana, S.A.: 1-18.
- Avello, M. y Suwalsky, M. (2006). "Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección." Atenea **494**: 161-172.
- Boticario, C. y Cascales, M. (2009). Innovaciones en Cáncer, UNED.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. y Berset, C. (1995). "Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity." **28**: 25-30.
- Bureau, P. A. S. (1981). Guías para la vigilancia prevención y control de la fiebre amarilla, Organizacion Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana.

- Busmann, R. W., Malca-García, G., Glenn, A., Sharon, D., Chait, G., Díaz, D., Pourmand, K., Jonat, B., Somogy, S., Guardado, G., Aguirre, C., Chan, R., Meyer, K., Kuhlman, A., Townesmith, A., Effio-Carbajal, J., Frías-Fernandez, F. y Benito, M. (2010). "Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies." Journal of Ethnopharmacology **132**(1): 101-108.
- Cantón Moreno, R., Coque González, T. M. y Baquero Machales, F. (2006). Evolución y perspectivas futuras de la resistencia a los antimicrobianos. Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Editorial Médica Panamericana: 167-178.
- Cavaleri, S. J. e. a. (2005). Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing, American Society for Microbiology.
- Chen, Z., Bertin, R. y Frolid, G. (2013). "EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs." Food Chemistry **138**(1): 414-420.
- Choma, I. M. y Grzelak, E. M. (2011). "Bioautography detection in thin-layer chromatography." Journal of Chromatography A **1218**(19): 2684-2691.
- de S. Luna, J., dos Santos, A. F., de Lima, M. R. F., de Omena, M. C., de Mendonça, F. A. C., Bieber, L. W. y Sant'Ana, A. E. G. (2005). "A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil." Journal of Ethnopharmacology **97**(2): 199-206.
- Devlin, T. M. (2004). Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas, Reverté.
- Fabry, W., Okemo, P. O. y Ansorg, R. (1998). "Antibacterial activity of East African medicinal plants." Journal of Ethnopharmacology **60**: 79-84.
- Ferreira de Lima, M. R., de Souza Luna, J., Feitosa dos Santos, A., Caño de Andrade, M. C., Goulart Sant'Ana, A. E., Genet, J.-P., Marquez, B., Neuville, L. y Moreau, N. (2006). "Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants." Journal of Ethnopharmacology **105**(1-2): 137-147.
- Fonnegra, R. y Jiménez, S. L. (2007). Plantas medicinales aprobadas en Colombia, Editorial Universidad de Antioquia.
- García, V. (2004). Introducción a la microbiología, Euned.
- Huang, D., Ou, B. y Prior, R. L. (2005). "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays." Journal of Agricultural and Food Chemistry **53**(6): 1841-1856.
- Izco, J. (1997). Botánica, McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.
- Kloucek, P., Polesny, Z., Svobodova, B., Vlkova, E. y Kokoska, L. (2005). "Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District." Journal of Ethnopharmacology **99**(2): 309-312.
- Koleva, I. I., van Beek, T. A., Linssen, J. P. H., Groot, A. d. y Evstatieva, L. N. (2002). "Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods." Phytochemical Analysis **13**(1): 8-17.
- Kouakou-Siransy, G., Sahpaz, S., Irié-Nguessan, G., Datte, Y. J., Kablan, J., Gressier, B. y Bailleul, F. (2010). "Oxygen species scavenger activities and phenolic contents of four West African plants." Food Chemistry **118**(2): 430-435.
- Lizcano, L. J., Bakkali, F., Begoña Ruiz-Larrea, M. y Ignacio Ruiz-Sanz, J. (2010). "Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use." Food Chemistry **119**(4): 1566-1570.

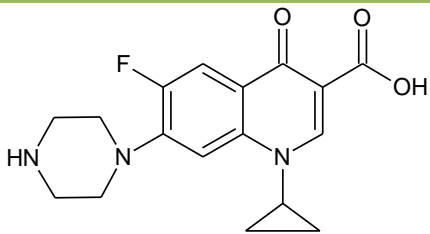
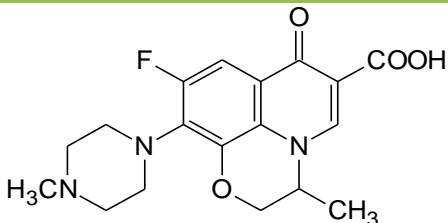
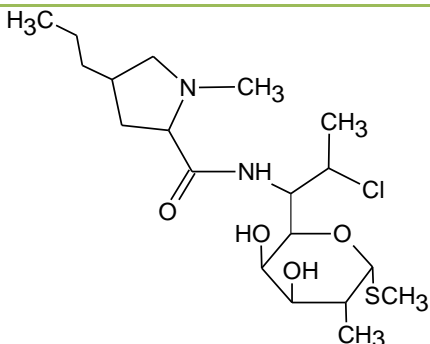
- Londoño, J. (2012). Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad. Desarrollo y transversalidad. Colombia, Corporación Universitaria Lasallista: 129-162.
- Lopez, A., Hudson, J. B. y Towers, G. H. N. (2001). "Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants." Journal of Ethnopharmacology **77**(2-3): 189-196.
- Macías S., K. L., Juárez F., B. I., Cárdenas O., N. C., Aguirre R., J. R. y Jasso P., Y. (2009). "Evaluación de plantas tradicionalmente utilizadas en la desinfección de heridas." Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas **40**(2): 5-10.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., Fernández, M. G. y Pérez, M. S. (2003). Biología de los microorganismos: Brock, Pearson, Príncipe Hall.
- Martin Álvarez, R. y Pachón Díaz, J. (2006). Características generales de las infecciones bacterianas. Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología. Buenos Aires; Madrid, Editorial Médica Panamericana, S.A.: 247-252.
- Mensor, L. L., Menezes, F. S., Leitao, G. G., Reis, A. S., Santos, T. C. d., Coube, C. S. y Leitao, S. G. (2001). "Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method." Phytotherapy Research **15**(2): 127-130.
- Mirelis Otero, B. y Gurgui Ferrer, M. (2006). Medicamentos antibacterianos. Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Editorial Médica Panamericana: 97-116.
- MMA (1996). Política nacional de biodiversidad Colombia, Ministerio del medio ambiente. Departamento nacional de planeación. Instituto "Alexander Von Humboldt".
- Moon, J.-K. y Shibamoto, T. (2009). "Antioxidant Assays for Plant and Food Components." Journal of Agricultural and Food Chemistry **57**(5): 1655-1666.
- Moreno M, C., González E, R. y Beltrán, C. (2009). "Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios." Revista de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello **69**: 185-192.
- Mosquera M., O. M., Niño O., J., Buitrago Bejarano, D. C. y Correa, Y. M. (2007). "Antioxidant activity of twenty five plants from Colombian biodiversity." Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **102**(5): 631-634.
- Mosquera M., O. M., Niño O., J., Correa, Y. M. y Buitrago Bejarano, D. C. (2005). "Estandarización del método de captura de radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales." Scientia et Technica **XI**(27).
- Muñoz Juárez, M. A. y Gutiérrez, D. M. (2008). Determinación de actividad antioxidante de diversas partes del árbol Nicotiana Glauca. 10° Verano de la Ciencia de la Región Centro, Universidad Autónoma de Querétaro.
- Navarro Risueño, F., Cuenca Estrella, M. y Pumarola Suñé, T. (2006). Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Editorial Médica Panamericana: 153-166.
- OMS (2010). Dengue Guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control, Organización Mundial de la Salud y Programa Especial para la Investigación y Capacitación de Enfermedades Tropicales.
- OMS (2011). Fiebre amarilla, Organización Mundial de la Salud.
- OPS/OMS (2011). Manual de vigilancia y control de Aedes aegypti, Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud.

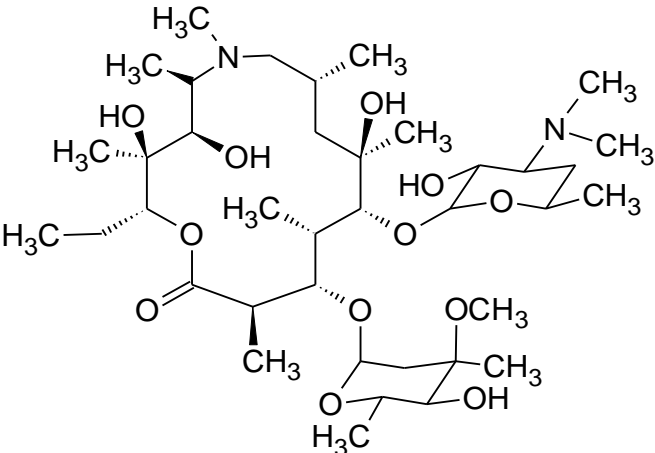
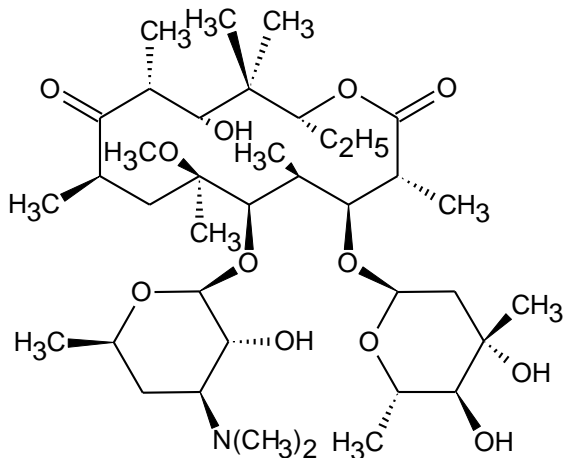
- Pesewu, G. A., Cutler, R. R. y Humber, D. P. (2008). "Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA." Journal of Ethnopharmacology **116**(1): 102-111.
- Pino, N. y Stashenko, E. E. (2009). "Validación antibiótica de plantas medicinales del noroeste de Colombia contra *Staphylococcus aureus*." Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas **8**(2): 145-150.
- Poullain, C., Girard-Valenciennes, E. y Smadja, J. (2004). "Plants from reunion island: evaluation of their free radical scavenging and antioxidant activities." Journal of Ethnopharmacology **95**(1): 19-26.
- Pumarola, A. (1991). Microbiología y parasitología médica, Salvat.
- Ramirez, L. S. y Marin, D. (2009). "Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal." Scientia et Technica **15**(42).
- Restrepo, A., Robledo, J., Leiderman, E., Restrepo, M., Botero, D. y Bedoya, V. I. (2003). Enfermedades infecciosas 6. Ed, Corporación para Investigaciones Biológicas.
- Ríos, J. L. y Recio, M. C. (2005). "Medicinal plants and antimicrobial activity." Journal of Ethnopharmacology **100**(1-2): 80-84.
- Rojas Barrios, E. R., García González, R. y Morales Medrano, A. J. (2010). Actividad de Extractos Vegetales Sobre Larvas de Insectos de Importancia en Entomología Médica. Facultad de ciencias químicas y farmacia. Guatemala, Universidad San Carlos de Guatemala.
- Rojas, M. O. (2007). El virus de la fiebre amarilla "Un virus científicamente olvidado". Universidad, Ciencia y Desarrollo Programa de Divulgación Científica Universidad del Rosario, Tomo 2, fascículo No. 8. U. d. Rosario.
- Salvatella, R. (1996). "Aedes aegypti, Aedes albopictus (Diptera, Culicidae) y su papel como vectores en las Américas." Revista Médica del Uruguay **12**: 28-36.
- Samarth, R. M., Panwar, M., Kumar, M., Soni, A., Kumar, M. y Kumar, A. (2008). "Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extracts." Food Chemistry **106**(2): 868-873.
- Sánchez-Medina, A., García-Sosa, K., May-Pat, F. y Peña-Rodríguez, L. M. (2001). "Evaluation of biological activity of crude extracts from plants used in Yucatecan Traditional Medicine Part I. Antioxidant, antimicrobial and β -glucosidase inhibition activities." Phytomedicine **8**(2): 144-151.
- Singh, K. K. U. S. (2010). Introductory Microbiology, Oxford Book Company.
- Thambiraj J, Paulsamy S y Sevukaperumal, R. (2012). "Evaluation of in vitro antioxidant activity in the traditional medicinal shrub of western districts of Tamilnadu, India, *Acalypha fruticosa* Forssk. (Euphorbiaceae)." Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine: S127-S130.
- Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. (2007). Introducción a la microbiología, Editorial Medica Panamericana Sa de.
- Velandia, M. L. y Castellanos, J. E. (2011). "Virus del dengue Estructura y ciclo viral." Infectio **15**(1): 33-43.
- Velázquez, E., Tournier, H. A., Mordujovich de Buschiazso, P., Saavedra, G. y Schinella, G. R. (2003). "Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts." Fitoterapia **74**(1-2): 91-97.
- WHO (2012). Dengue y dengue hemorrágico, World Health Organization.

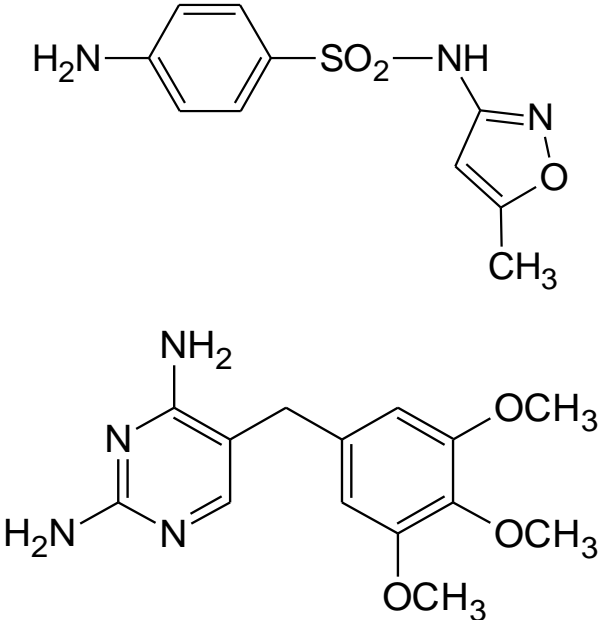
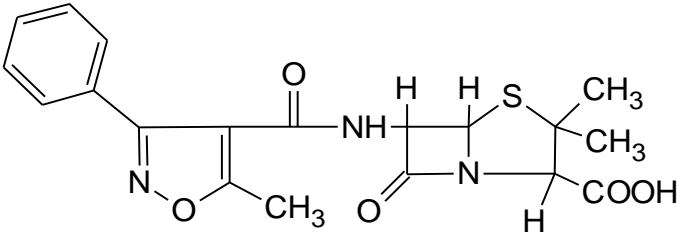
- Yang, Y.-C., Park, I.-K., Kim, E.-H., Lee, H.-S. y Ahn, Y.-J. (2004). "Larvicidal Activity of Medicinal Plant Extracts Against *Aedes aegypti*, *Ochlerotatus togoi*, and *Culex pipiens pal/ens* (Diptera: Culicidae)." Journal of Asia-Pacific Entomology **7**(2): 227-232.
- Yasunaka, K., Abe, F., Nagayama, A., Okabe, H., Lozada-Pérez, L., López-Villafranco, E., Muñiz, E. E., Aguilar, A. y Reyes-Chilpa, R. (2005). "Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthones." Journal of Ethnopharmacology **97**(2): 293-299.

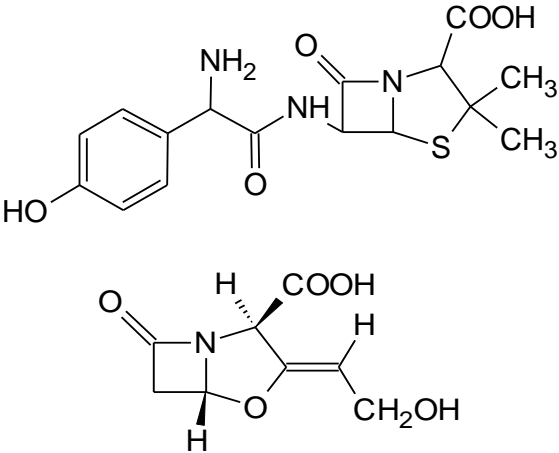
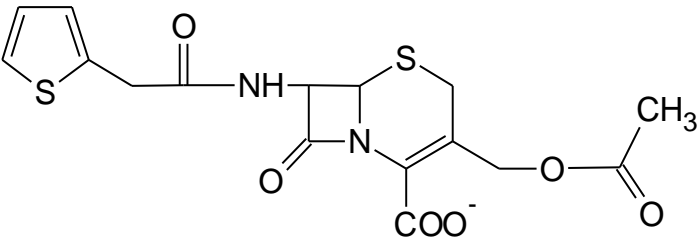
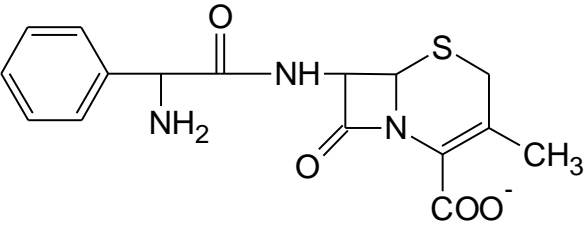
9. ANEXOS

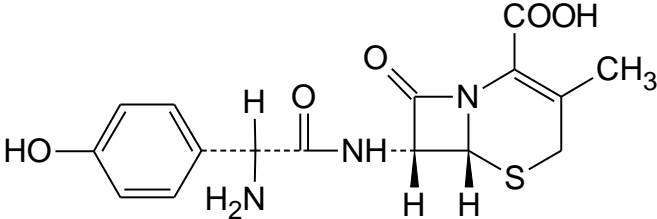
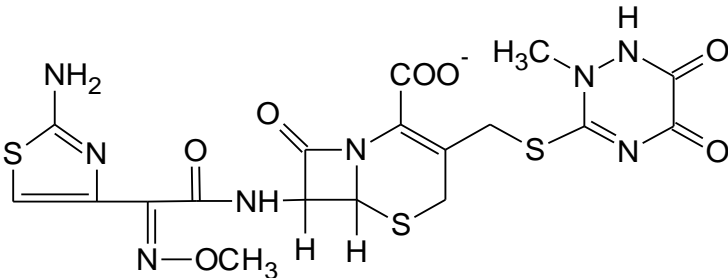
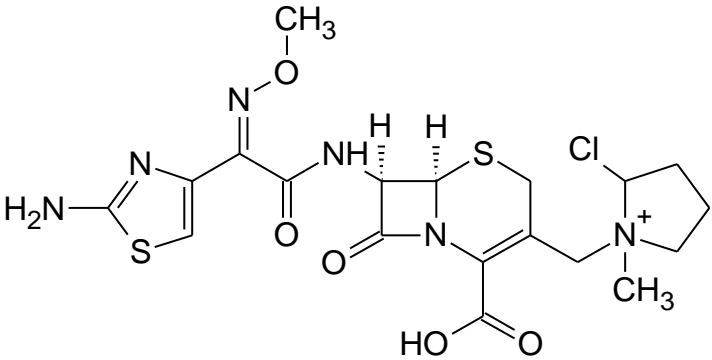
9.1. ANEXO 1. Información de los antibióticos ante los cuales presentan resistencia las bacterias aisladas clínicamente.

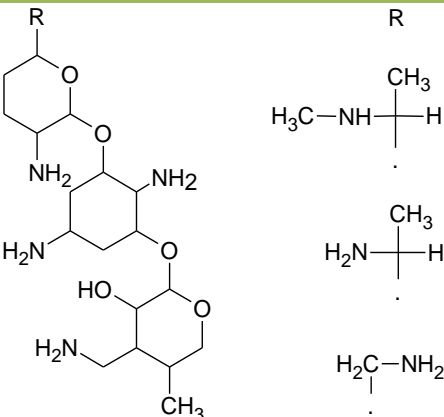
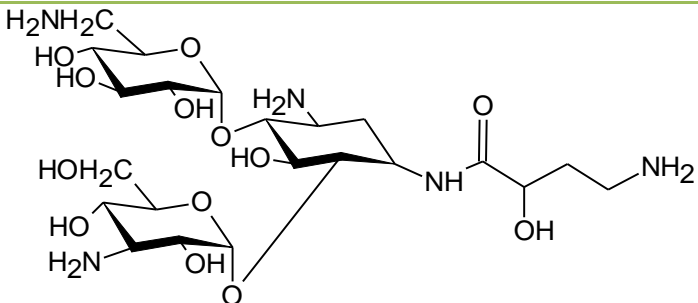
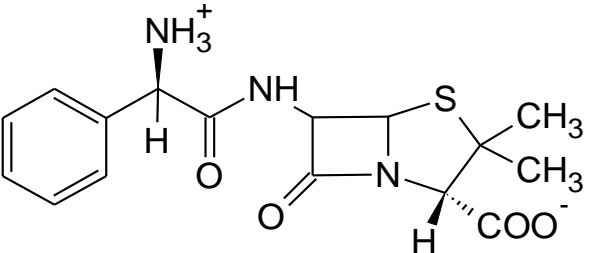
Familia antibiótico	Nombre del antibiótico	Estructura química	Tipo de antibiótico	Lugar y mecanismo de acción
Quinolonas de segunda generación.	Ciprofloxacina		Bacteriostático	Actúa sobre el nucleóide interfiriendo en la duplicación del ADN.
	Levofloxacina			
Lincosaminas	Clindamicina		Bacteriostático	El blanco de acción son los ribosomas bloqueando la elongación de las proteínas.

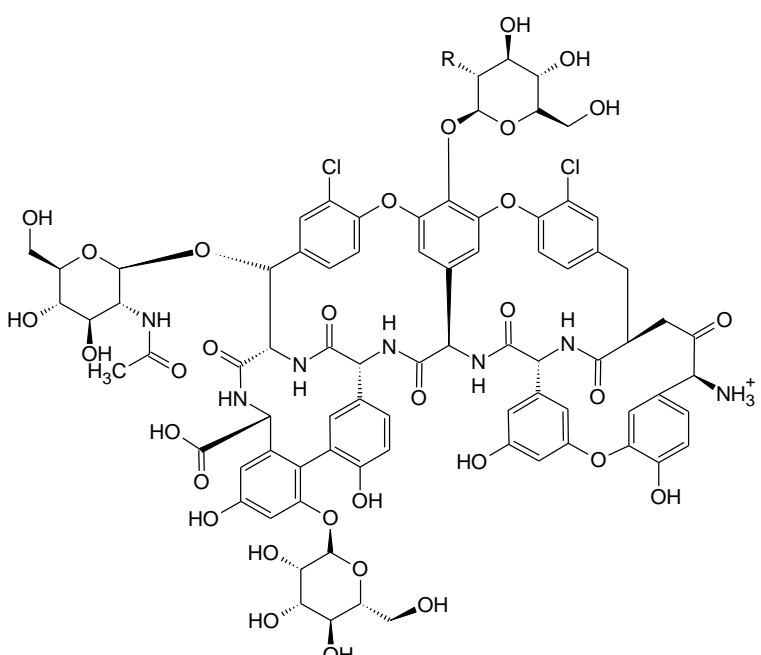
Familia del antibiótico	Nombre del antibiótico	Estructura química	Tipo de antibiótico	Lugar y mecanismo de acción
Macrólidos	Azitromicina	 The chemical structure of Azitromycin is a 15-membered macrolide ring. It features a methyl group and a hydroxyl group on the ring, a methoxy group, and a side chain containing a dimethylamino group and a methyl group. It also has a tetrahydropyran ring fused to the main structure, which includes a methoxy group and a hydroxyl group.	Bacteriostático	Actúa sobre los ribosomas interfiriendo en la síntesis proteica.
	Claritromicina	 The chemical structure of Clarithromycin is a 14-membered macrolide ring. It features a methyl group, a methoxy group, and a hydroxyl group on the ring. It has a side chain with a methyl group and a hydroxyl group, and a tetrahydropyran ring fused to the main structure, which includes a methyl group and a hydroxyl group.		

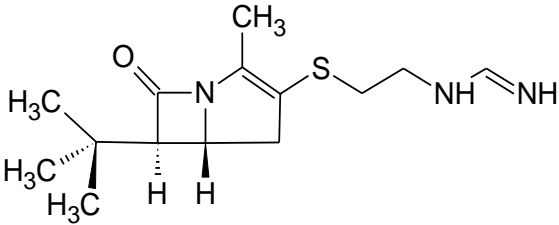
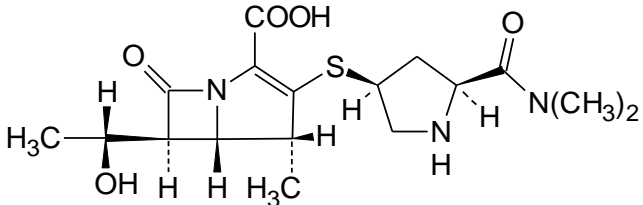
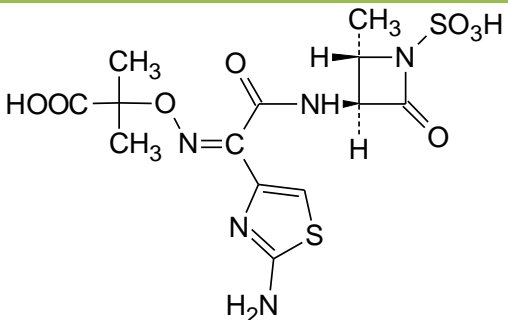
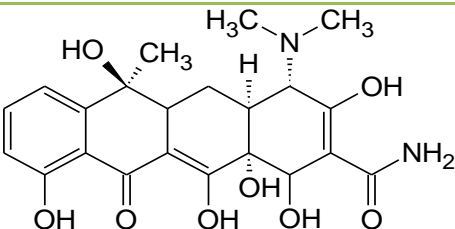
Familia del antibiótico	Nombre del antibiótico	Estructura química	Tipo de antibiótico	Lugar y mecanismo de acción
Sulfamidas	Sulfametoxazol-Trimetroprim		Bacteriostático	Interfiere en la síntesis de los precursores de las bases púricas y pirimidínicas.
β -lactámicos Grupo: Penicilinas isoxazólicas	Oxacilina		Bactericida	Actúa sobre la pared celular interfiriendo en la síntesis de peptidoglucano.

Familia del antibiótico	Nombre del antibiótico	Estructura química	Tipo de antibiótico	Lugar y mecanismo de acción
β -lactámicos con inhibidor de β -lactamasas Grupo: Aminopenicilinas	Amoxicilina-Clavulanato		Bactericida	Actúa sobre la pared celular interfiriendo en la síntesis de peptidoglucano.
β -lactámicos Grupo: Cefalosporinas de primera generación	Cefalotina		Bactericida	Interfiere en la síntesis de la pared celular.
	Cefalexina			

Familia del antibiótico	Nombre del antibiótico	Estructura química	Tipo de antibiótico	Lugar y mecanismo de acción
β -lactámicos Grupo: Cefalosporinas de tercera generación	Ceftacidima		Bactericida	Inhibición de la síntesis de la pared celular
	Ceftriaxona			
β -lactámicos Grupo: Cefalosporinas de cuarta generación	Cefepime		Bactericida	Inhibe la síntesis de la pared celular

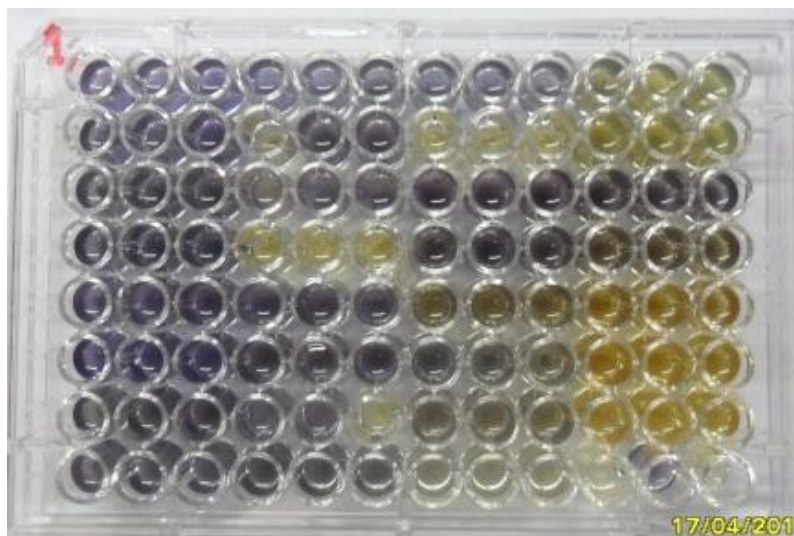
Familia del antibiótico	Nombre del antibiótico	Estructura química	Tipo de antibiótico	Lugar y mecanismo de acción
Aminoglucósidos	Gentamicina		Bactericida	Actúa sobre los ribosomas bacterianos interfiriendo en la síntesis de proteínas.
	Amicacina			
β-lactámicos	Ampicilina-Sulbactam		Bactericida	Inhibe la síntesis de la pared celular

Familia del antibiótico	Nombre del antibiótico	Estructura química	Tipo de antibiótico	Lugar y mecanismo de acción
Polimixinas	Polimixina B	<p> $\begin{array}{l} \text{L-DAB-D-Phe-L-Leu} \\ \text{R-L-DAB-L-Thr-L-DAB-L-DAB} \begin{array}{l} \diagup \\ \diagdown \end{array} \\ \text{L-Thr-L-DAB-L-DAB} \end{array}$ </p> <p>Polimixina B₁ R:(+)-6-metiloctanoil</p> <p>Polimixina B₂ R:6-metiloctanoil</p>	Bactericida	Actúa sobre la membrana citoplasmática aumentando la permeabilidad y produciendo finalmente lisis celular.
Glucopéptidos	Teicoplanina		Bactericida	Actúa sobre la pared celular inhibiendo la elongación del peptidoglucano.

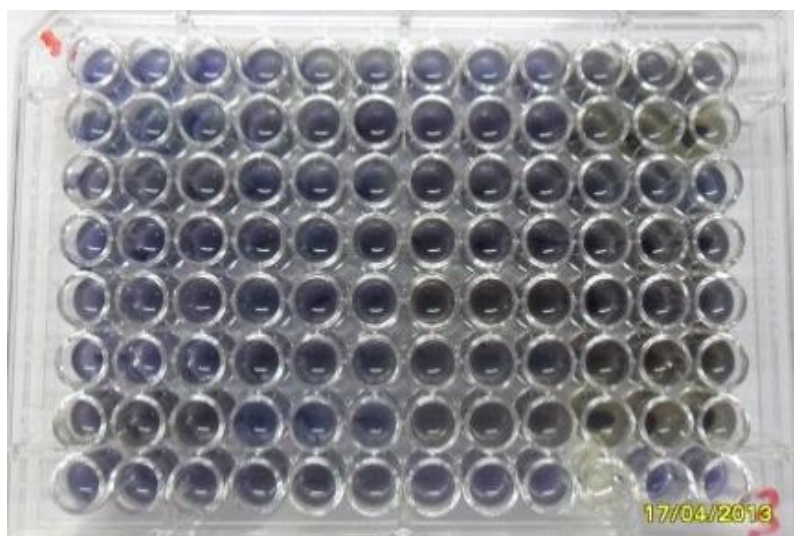
Familia del antibiótico	Nombre del antibiótico	Estructura química	Tipo de antibiótico	Lugar y mecanismo de acción
β-lactámicos Grupo: Carbapenemes	Imipenem		Bactericida	Inhibe la síntesis de la pared celular.
	Meropenem			
β-lactámicos Grupo: Monobactámicos	Aztreonam			
Tetraciclinas	Tetraciclina		Bacteriostático	Actúa sobre el ribosoma inhibiendo la síntesis proteica.

9.2. ANEXO 2

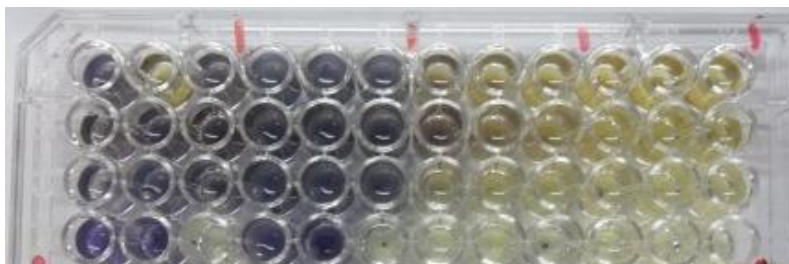
Fotos de las microplacas reveladas con MTT a una concentración de 0,5 µg/mL y con un tiempo de incubación de 30 minutos para evaluación de actividad metabólica.



Resultados frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de los extractos 1 a 31.
Control de inhibición, control de crecimiento y control de esterilidad



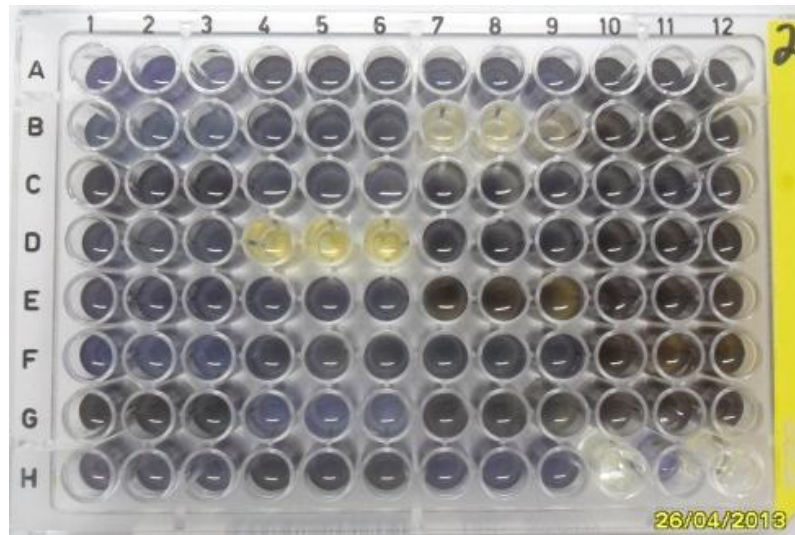
Resultados frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 de los extractos 1 a 31.
Control de inhibición, control de crecimiento y control de esterilidad



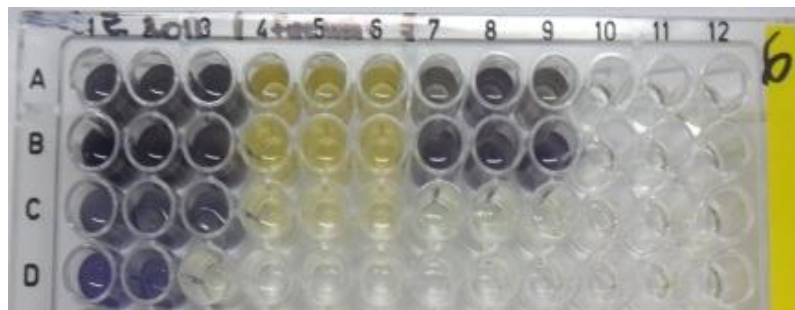
Resultados frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 de los extractos 32 a 34 y control de solvente



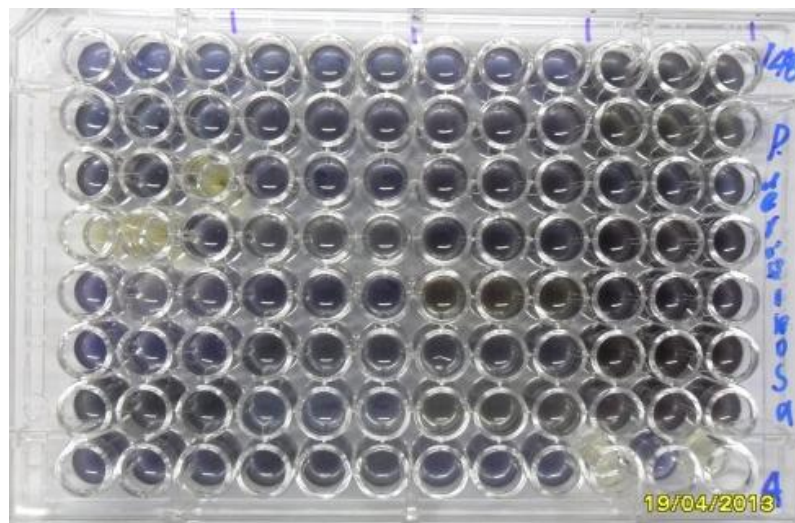
Resultados frente a *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA1705 de los extractos 1 a 31.
Control de inhibición, control de crecimiento y control de esterilidad



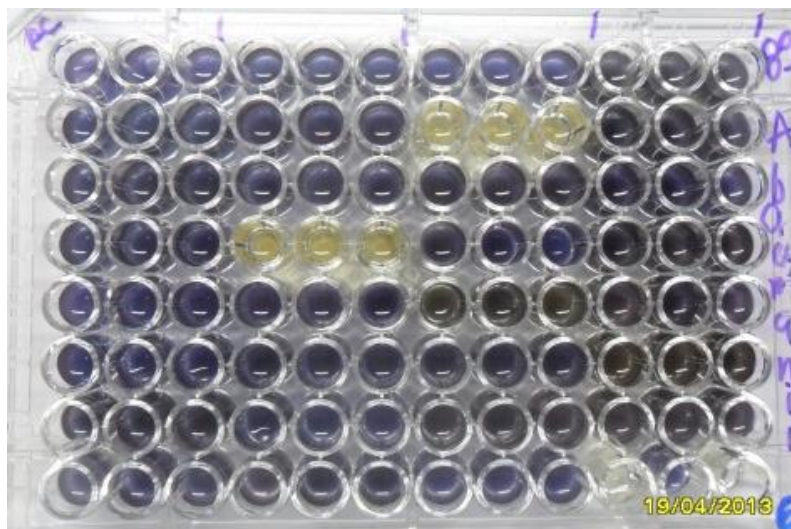
Resultados frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 de los extractos 1 a 31.
Control de inhibición, control de crecimiento y control de esterilidad



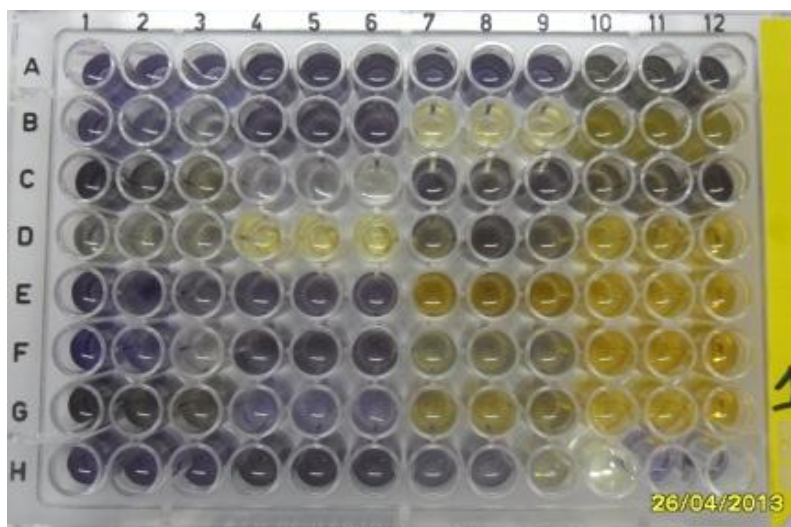
Resultados frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 de los extractos 32 a 34 y control del
solvente



Resultados frente a *Pseudomonas aeruginosa* IC148 de los extractos 1 a 31.
Control de inhibición, control de crecimiento y control de esterilidad



Resultados frente a *Acinetobacter baumannii* IC89 de los extractos 1 a 31.
Control de inhibición, control de crecimiento y control de esterilidad



Resultados frente a *Staphylococcus aureus* IC262 de los extractos 1 a 31.
Control de inhibición, control de crecimiento y control de esterilidad





Resultados frente a *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA1705, *Pseudomonas aeruginosa* IC148, *Acinetobacter baumannii* IC89 y *Staphylococcus aureus* IC262 de los extractos 32 a 34 y control del solvente para cada una.

9.3. ANEXO 3. Porcentaje de actividad antioxidante para cada extracto a las diferentes concentraciones evaluadas.

Extracto metanólico		% Actividad Antioxidante						
Familia	Especie/ Concentración (ppm)	500	250	125	62,50	31,25	15,625	7,8125
Solanaceae	<i>Solanum acerifolium</i>	74,72	76,74	48,29	26,86	18,33	14,62	9,41
	<i>Solanum cf umbellatum</i>	92,50	83,69	55,01	39,56	28,70	24,44	32,38
	<i>Dunalia solanacea</i>	48,33	30,06	18,55	7,56	7,92	7,09	13,09
	<i>Solanum ovalifolium</i>	95,09	86,73	57,25	45,59	29,30	22,80	21,75
	<i>Cestrum sp</i>	70,07	72,78	58,77	48,80	40,10	38,20	37,04
	<i>Browallia speciosa</i>	64,34	41,56	24,58	12,46	6,39	2,32	0
	<i>Deprea aff sachapapa</i>	0	0	0	0	0	0	0
	<i>Solanum brevifolium</i>	46,27	13,70	0	0	0	0	0
	<i>Solanum sp</i>	87,61	74,63	50,90	32,06	20,52	12,17	7,74
	<i>Witheringia coccoloboides</i>	84,75	42,13	3,25	0	0	0	0
	<i>Solanum trachycyphum</i>	20,25	0	0	0	0	0	0
	<i>Solanum sp</i>	87,15	67,95	24,67	17,09	4,68	0	0
	<i>Solandra coriacea</i>	71,28	56,14	39,82	27,88	19,97	20,11	12,24
	<i>Cestrum humboldtii</i>	15,12	0	0	0	0	0	0
	<i>Solanum lepidotum</i>	76,69	57,18	37,66	27,03	19,57	14,97	14,14
	<i>Lycianthes radiata</i>	100	48,44	14,41	0	0	0	0
	<i>Solanum sp</i>	90,93	49,74	11,87	0	0	0	0
Piperaceae	<i>Piper pesaresanum</i>	100	41,58	35,35	31,65	25,86	19,95	14,73
	<i>Piper daniel-gonzalezii</i>	100	98,22	97,23	78,09	58,81	48,19	43,32
	<i>Piper glanduligerum</i>	81,54	69,93	55,53	44,77	35,70	32,13	27,84
	<i>Piper crassinervium</i>	90,76	95,71	85,57	64,38	46,89	37,67	35,88
	<i>Piper umbellatum</i>	59,64	33,53	27,48	28,47	16,97	17,53	26,28
	<i>Piper crassinervium</i>	84,39	90,03	72,08	56,55	44,24	39,71	35,71
	<i>Peperomia acuminata</i>	93,75	82,25	75,03	64,95	58,72	51,72	43,57
	<i>Piper eriopodon</i>	92,70	91,12	79,59	62,76	51,00	43,08	35,68
	<i>Piper calceolarium</i>	79,92	70,06	55,26	46,69	43,30	40,34	36,70
Euphorbiaceae	<i>Acalypha macrostachya</i>	82,43	80,43	51,12	29,74	26,25	7,81	2,17
	<i>Alchornea</i>	87,10	98,77	96,48	86,84	55,51	35,15	19,64
	<i>Alchornea grandis</i>	87,82	98,87	99,42	97,41	91,30	74,64	47,32
	<i>Acalypha diversifolia</i>	97,63	100	100	97,63	96,90	98,71	84,37
	<i>Alchornea calophylla</i>	94,35	95,29	98,25	94,49	97,15	94,48	76,00
	<i>Hyeronima antioquiensis</i>	92,25	99,55	100	96,60	73,88	48,71	26,09
	<i>Mabea montana</i>	95,25	95,54	96,31	97,51	95,18	84,04	55,71
	<i>Hyeronima sp</i>	96,59	97,99	75,68	47,60	19,20	7,04	0

9.4. ANEXO 4. Resultados de la evaluación de actividad larvícida.

 UFAL	Universidade Federal de Alagoas Instituto de Química e Biotecnologia Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais – LPqRN <i>Setor de bioensaio larvícida</i>	 LPqRN
--------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------

Bioensaio Larvícida

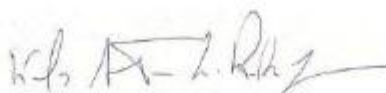
Responsável pelos Ensaios: Thyago

Origem: Colômbia

Responsável pelos extratos: Aura & Angelica

Tempo de Exposição: 48h.....Estádio: Quarto instar.....

AMOSTRAS	24 HORAS	48 HORAS
16-154	1-0/10	1-0/10
	2-1/10	2-1/10
14-194	1-0/10	1-0/10
	2-0/10	2-0/10
19-197	1-0/10	1-0/10
	2-0/10	2-1/10
12-172	1-0/10	1-0/10
	2-0/10	2-0/10
19-175	1-1/10	1-1/10
	2-0/10	2-0/10
18-194	1-0/10	1-0/10
	2-0/10	2-0/10
11-167	1-0/10	1-0/10
	2-0/10	2-0/10
17-175	1-0/10	1-0/10
	2-0/10	2-0/10
2-148	1-1/10	1-2/10
	2-0/10	2-1/10
158	1-0/10	1-0/10
	2-0/10	2-0/10



Assinatura digitalizada

Supervisão dos ensaios
Setor larvícida

9.5. ANEXO 5. Resultados de la marcha fitoquímica de los extractos evaluados (Fuente: Grupo de Investigación Biotecnología y Productos naturales, GBPN, Universidad Tecnológica de Pereira)

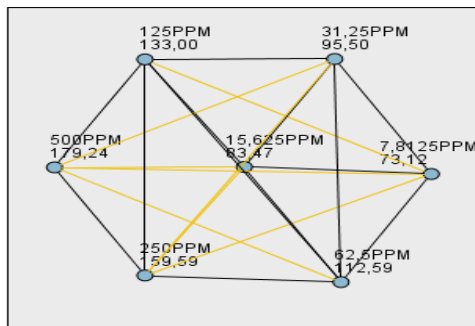
Cód. UTP	No. FJR	Familia	Especie	Núcleo fitoquímico					
				Alcaloides	Esteroles y triterpenos	Saponinas	Fenoles	Flavonoides	Taninos
120	3961	Solanaceae	<i>Solanum acerifolium</i>	+	+	+	-	-	-
121	3962		<i>Solanum cf umbellatum</i>	+	+	+	-	-	-
129	3970		<i>Solanum sp</i>	+	+	+	-	+	-
134	3975		<i>Solanum lepidotum</i>	-	-	+	-	+	-
137	3978		<i>Cestrum sp</i>	+	-	-	-	-	-
145	3992		<i>Dunalia solanacea</i>	+	-	-	+	+	+
146	3993		<i>Lycianthes radiata</i>	+++	-	-	+	-	+
161	4010		<i>Solanum sp</i>	+++	++	++	-	+	-
164	4013		<i>Solandra coriacea</i>	-	+	-	-	+	-
165	4019		<i>Witheringia coccoloboides</i>	++	-	-	+	+	+
168	4022		<i>Cestrum humboldtii</i>	++	-	-	-	-	-
170	4024		<i>Deprea aff sachapapa</i>	++	-	-	+	-	+
171	4025		<i>Browallia speciosa</i>	-	+++	+++	-	-	-
173	4027		<i>Solanum ovalifolium</i>	-	-	-	-	-	-
174	4028		<i>Solanum brevifolium</i>	++	++	-	-	-	-
188	4042		<i>Solanum trachycyphum</i>	+	+	+	-	-	-
189	4043		<i>Solanum sp</i>	++	+	-	+	-	-

148	3996	<i>Piperaceae</i>	<i>Piper pesaresanum</i>	+++	-	-	++	+	++
154	4002		<i>Peperomia acuminata</i>	++	+++	+++	+	++	+
158	4007		<i>Piper eriopodon</i>	++	-	-	-	-	-
163	4012		<i>Piper umbellatum</i>	-	-	-	-	-	-
167	4021		<i>Piper crassinervium</i>	-	++	++	+++	++	+++
172	4026		<i>Piper glanduligerum</i>	++	-	-	-	+	-
175	4030		<i>Piper crassinervium</i>	-	++	++	+++	++	+++
194	4048		<i>Piper calceolarium</i>	-	+	+	+	+	+
197	4051		<i>Piper daniel-gonzalezii</i>	+	+	+	+	+	+
85	3905	<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Hyeronima antioquiensis</i>	-	-	+	+	+	+
92	3912		<i>Mabea montana</i>	+	+	+	+	+	+
126	3967		<i>Acalypha diversifolia</i>	-	-	-	+	-	+
128	3969		<i>Alchornea calophylla</i>	-	+	+	+	+	+
130	3971		<i>Hyeronima sp</i>	-	+	+	+	+	+
140	3982		<i>Alchornea</i>	-	+	+	+	-	+
196	4050		<i>Acalypha macrostachya</i>	-	+	+	+	+	+
202	4056		<i>Alchornea grandis</i>	+	+	+	+	+	+

(-): Ausencia del núcleo; (+): Presencia del núcleo; (++): Presencia intermedia; (+++): Presencia abundante.

9.6. ANEXO 6. Resultados de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para los grupos definidos por las siete concentraciones de extracto.

Comparaciones por parejas de concentración



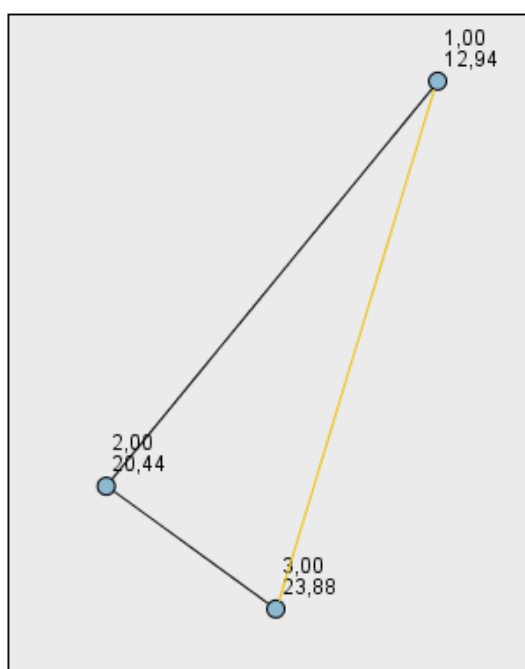
Cada nodo muestra el rango de media de muestras de concentración.

Muestra1-Muestra2	Prueba estadística	Error típico	Desv. Prueba estadística	Sig.	Sig. ady.
7,8125PPM-15,625PPM	-10,353	16,698	-,620	,535	1,000
7,8125PPM-31,25PPM	-22,382	16,698	-1,340	,180	1,000
7,8125PPM-62,5PPM	-39,471	16,698	-2,364	,018	,380
7,8125PPM-125PPM	-59,882	16,698	-3,586	,000	,007
7,8125PPM-250PPM	-86,471	16,698	-5,178	,000	,000
7,8125PPM-500PPM	-106,118	16,698	-6,355	,000	,000
15,625PPM-31,25PPM	-12,029	16,698	-,720	,471	1,000
15,625PPM-62,5PPM	-29,118	16,698	-1,744	,081	1,000
15,625PPM-125PPM	-49,529	16,698	-2,966	,003	,063
15,625PPM-250PPM	-76,118	16,698	-4,558	,000	,000
15,625PPM-500PPM	-95,765	16,698	-5,735	,000	,000
31,25PPM-62,5PPM	-17,088	16,698	-1,023	,306	1,000
31,25PPM-125PPM	-37,500	16,698	-2,246	,025	,519
31,25PPM-250PPM	-64,088	16,698	-3,838	,000	,003
31,25PPM-500PPM	-83,735	16,698	-5,015	,000	,000
62,5PPM-125PPM	-20,412	16,698	-1,222	,222	1,000
62,5PPM-250PPM	-47,000	16,698	-2,815	,005	,103
62,5PPM-500PPM	-66,647	16,698	-3,991	,000	,001
125PPM-250PPM	-26,588	16,698	-1,592	,111	1,000
125PPM-500PPM	-46,235	16,698	-2,769	,006	,118
250PPM-500PPM	-19,647	16,698	-1,177	,239	1,000

Cada fila prueba la hipótesis nula que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas. Se muestran las significancias asintóticas (pruebas de 2 caras). El nivel de significancia es ,05.

9.7. ANEXO 7. Resultados de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para los grupos definidos por las tres familias botánicas a las cuales pertenecen los extractos.

Comparaciones por parejas de familia



Cada nodo muestra el rango de media de muestras de familia.

Muestra1-Muestra2	Prueba estadística	Error típico	Desv. Prueba estadística	Sig.	Sig. ady.
1,00-2,00	-7,503	4,105	-1,828	,068	,203
1,00-3,00	-10,934	4,270	-2,561	,010	,031
2,00-3,00	-3,431	4,839	-,709	,478	1,000

Cada fila prueba la hipótesis nula que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas. Se muestran las significancias asintóticas (pruebas de 2 caras). El nivel de significancia es ,05.

La numeración fue asignada a cada familia de la siguiente manera:

- 1,00 Familia *Solanaceae*.
- 2,00 Familia *Piperaceae*.
- 3,00 Familia *Euphorbiaceae*.